

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg - Universität Mainz

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON
PROTEASEHEMMERN UND ALKOHOLEN
AUF DIE CON A - INDUZIERTER STIMULATION
VON MAUSMILZZELLEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg - Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von

Astrid Raile, geb. Ehmig
aus Hofheim am Taunus

Mainz ~~1983~~
1984





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg - Universität Mainz

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON
PROTEASEHEMMERN UND ALKOHOLEN
AUF DIE CON A - INDUZIERTER STIMULATION
VON MAUSMILZZELLEN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg - Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von

Astrid Raile, geb. Ehmig

aus Hofheim am Taunus

Mainz 1983

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON
PROTEASOMEN UND ALKOHOL
AUF DIE DNA-METHYLIERTUNG
VON MAUSLEBERN

DEKAN: Prof. Dr. Dr. W. Ketterl

1. GUTACHTER: Prof. Dr. M.P. Dierich

2. GUTACHTER: Prof. Dr. E. Rude

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 1984

Mein ganz besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. M.P. Dierich
für die Aufgabenstellung,
für die verwendeten Materialien
und seine stets hilfreiche Betreuung

Herrn Dr. K.P. Hammann
für die Einführung in die Methoden
der Lymphozytenstimulation und für seine
jederzeit freundliche und geduldige
Unterstützung meiner Arbeit

Herrn Prof. Dr. E. Rüde
für seine Mühe als zweiter Gutachter
dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien und Reagenzien

2.2. Sonstige Materialien, Geräte und Maschinen

2.3. Versuchstiere

2.4. Herstellung der Lösungen

2.5. Gewinnung der Zellen

2.6. Zellkultivierung

2.7. "Ernte" der Zellen - Messung des Einbaus ^3H -markierten Thymidins in die DNA

2.8. Experimente mit der 3. Komplementkomponente (C3)

2.9. Beobachtung der Vitalität der Zellen

2.10. Beobachtung des Aggregationsverhaltens

2.11. Entfernung und Anreicherung der Monozyten/Makrophagen

3. ERGEBNISSE

3.1. Erfahrungen mit einer Präparation der 3. Komplementkomponente (C3) als Hinführung zu den Ergebnissen mit Proteasehemmern

3.1.1. "Cordis-C3" steigert die Stimulierung von Maus-Milzzellen (MMZ) durch Concanavalin A (ConA)

3.1.2. Testung von Sephadex G-100 Fraktionen der C3-Präparation

3.1.3. Versuch, die aktive Substanz in der 3. Fraktion näher zu charakterisieren



3.2. Proteasehemmer (PH)

- 3.2.1. Einfluß der Proteasehemmer DFP, PMSF, TLCK und SBTI (α -1-AT und Trasylol) auf die Stimulierung von MMZ
- 3.2.2. Vergleich der Wirksamkeit von SBTI, PMSF, DFP und TLCK
- 3.2.3. Messung des ^3H -Thymidineinbaus in ConA-stimulierte MMZ unter Einfluß von Proteasehemmern nach vier, 24, 48 und 72 Stunden
- 3.2.4. Einfluß der Proteasehemmer auf die ConA-Stimulierung von MMZ bei Zugabe nach verschiedenen Kulturzeiten
- 3.2.5. Beobachtung der Vitalität von ConA-stimulierten MMZ bei verschiedenen PH-Konzentrationen im Vergleich zum ^3H -Thymidineinbau
- 3.2.6. Beobachtung des Aggregationsverhaltens von ConA-stimulierten MMZ bei verschiedenen PH-Konzentrationen im Vergleich zum ^3H -Thymidineinbau
- 3.2.7. Einfluß von DFP auf den ConA-induzierten ^3H -Thymidineinbau von Lymphozyten des Thymus und des peripheren Blutes im Vergleich zu MMZ
- 3.2.8. Einfluß einer Erhöhung und Erniedrigung des Anteils an phagozytierenden und adhärierenden Zellen auf den Effekt der Proteasehemmer

3.3. Alkohole

- 3.3.1. Einfluß der Alkohole 2-Propanol, 1-Propanol, Äthanol und Äthylenglykoll sowie Einfluß von Azeton auf die Stimulierung von MMZ
- 3.3.2. Beobachtung der Vitalität von ConA-stimulierten MMZ bei verschiedenen Alkohol-Konzentrationen im Vergleich zum ^3H -Thymidineinbau
- 3.3.3. Beobachtung des Aggregationsverhaltens von ConA-stimulierten MMZ bei verschiedenen Alkohol-Konzentrationen im Vergleich zum ^3H -Thymidineinbau

4. DISKUSSION

4.1. Proteasehemmer

4.2. Alkohole

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. LITERATURVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

AK	Antikörper
α -1-AT	α -1-Antitrypsin
ATP	Adenosintriphosphat
BTEE	M-benzoyl-L-tyrosine-ethyl-ester
C3	3. Komplementkomponente
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
ConA	Concanavalin A
DFP	Di-isopropylfluorophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAC 14°2	Schafserythrozyten, beladen mit Antikörper, C 1, C4 und oxidiertem C2
FCS	Fetales Kälberserum
^3H -TdR	^3H -markiertes Thymidin
^3H -UdR	^3H -markiertes Uridin
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic-acid
HM	Hank's Medium
IL	Interleukin
IPM	Impulse pro Minute
LAF	Lymphozyten aktivierender Faktor
LPS	Lipopolysaccharide
α -2-M	α -2-Makroglobulin
MEM	Minimum Essential Medium
MMZ	Maus-Milz-Zellen
MPBL	Maus-periphere-Blutlymphozyten
MTHY	Maus-Thymozyten
MTP	Mikrotiterplatte
MØ	Makrophagen
PBL	Lymphozyten des peripheren Blutes
PH	Proteasehemmer

PHA	Phytohämagglutinin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PWM	pokeweed mitogen
R4	Reagenz 4, hydrazinbehandeltes Serum
RNA	Ribonukleinsäure
SBTI	Sojabohnen-Trypsininhibitor
TAME	N- α -tosyl-L-arginine methyl ester
TCGF	T-cell growth factor
TLCK	N- α -tosyl-L-lysyl-L-chloro-methyl-Ketone
TPCK	N- α -tosyl-L-phenyl-alanyl-chloromethane

1. EINLEITUNG

Verschiedene Mitogene, wie Phytohämagglutinin (PHA), Concanavalin A (ConA) und Lipopolysaccharide (LPS) von Bakterien aktivieren Lymphozyten und verursachen eine Blasten-Transformation. PHA und ConA in gelöster Form aktivieren selektiv T-Lymphozyten, während LPS B-Lymphozyten aktiviert. Lymphozyten, die durch Mitogene stimuliert sind, synthetisieren DNS, gehen in Mitose und sezernieren Lymphokine. Diese Wirkung von Mitogenen ist ähnlich der, die sensibilisierte Lymphozyten aufweisen, wenn sie in Kontakt mit dem spezifischen Antigen kommen. Sie betrifft jedoch zahlreiche Lymphozyten, d.h. nicht nur diejenigen, deren Membranen Antikörper tragen, die spezifisch die Antigendeterminanten binden. Man nennt deshalb Mitogene auch polyklonale Aktivatoren. Aktivierte Lymphozyten vergrößern und teilen sich. Die Blasten-Transformation (Transformation in "blast-like-cells") kann man biochemisch (durch den Einbau radioaktiv markierter Vorläufer in neu synthetisiertes Protein oder in Nukleinsäuren) oder morphologisch nachweisen. Die Blasten sind große Zellen (15-20 µm) mit reichlichem Zytoplasma und großen Kernen mit deutlichen Nukleoli (1).

Im Falle der B-Zell-Aktivierung, die in einer Immunglobulinsynthese resultiert, kann auch die Antikörperbildung zur Beurteilung der Stimulation herangezogen werden (Immunfluoreszenz-Färbung, Jerne-Plaques-Technik, Radioimmunoassay). Obwohl eine biochemische Beurteilung der Lymphozyten-Transformation viele Vorteile hat, erlaubt im

eigentlichen Sinne nur eine morphologische Beurteilung eine Abschätzung des Anteils an "blast-like-cells" (2).

Die Antigen- bzw. Mitogenstimulation induziert sowohl einen Zellvermehrungs- als auch einen Differenzierungsprozeß. Dabei geht im Falle der B-Zell-Aktivierung die Zellvermehrung nicht in jedem Falle mit einer Antikörperbildung einher und umgekehrt (3).

Auch bei der T-Zell-Aktivierung kann die Proliferation von T-Lymphozyten mit der Ausbildung von Effektorfunktionen einhergehen, es wird aber diskutiert, ob nicht beide Phänomene unabhängig voneinander auftreten können (4).

Die Methode, den Einbau radioaktiv markierten Thymidins in die DNA sich teilender Zellen zu messen, erlaubt daher genaugenommen nur eine Aussage über die *Proliferation* der dem Antigen bzw. Mitogen ausgesetzten Zellen.

"Stimulierung oder Aktivierung" führt jedoch auch zu zahlreichen Differenzierungsphänomenen (im Sinne der Festlegung einer Zelle auf bestimmte Funktionen): B-Zellen differenzieren sich z.B. in antikörperbildende Zellen, T-Zellen üben bestimmte Effektorfunktionen aus und nehmen durch die Sekretion von Mediatormolekülen an zahlreichen Zellinteraktionen teil. Daß solche Zellinteraktionen (z.B. LAF, TCGF) ihrerseits wiederum die Proliferation anderer Zellen beeinflussen, macht die Verflechtung von "Proliferation" und "Differenzierung" deutlich. In der vorliegenden Arbeit wollen wir uns jedoch auf den Aspekt der Proliferation innerhalb der ConA-Stimulation durch Messung des ^3H -Thymidineinbaus in die DNA von Maus-Milz-Zellen (MMZ) beschränken.

Proteolytische Aktivitäten werden überall in biologischen Systemen, z.B. bei der Blutgerinnung, Fibrinolyse, im Komplementsystem beobachtet. Es gibt aber auch zahlreiche Hinweise, daß Proteasen und Proteasehemmer innerhalb der Immunantwort bzw. bei der Immunregulation eine Rolle spielen: Proteasen können auf der Zelloberfläche von Lymphozyten nachgewiesen werden; Proteasehemmer können auf der Oberfläche von Lymphozyten und Granulozyten gebunden werden, und eine Zugabe von Proteasen und Proteasehemmern kann zahlreiche Lymphozytenfunktionen nachhaltig verändern (5). Von den im Serum vorkommenden Proteasehemmern (PH) wird besonders dem α -1-Antitrypsin (α -1-AT) und dem α -2-Makroglobulin (α -2-M) eine Beteiligung an der Immunregulation zugeschrieben (5). Aber auch synthetische und natürliche PH sind in der Lage, einen inhibierenden Effekt auf Lymphozytenaktivitäten wie Proliferation, Antikörperbildung oder zytotoxische Reaktionen auszuüben.

ANWESENHEIT VON PROTEASEN UND PROTEASEHEMMERN AUF DER OBERFLÄCHE VON LYMPHOZYTEN UND MAKROPHAGEN: GRAYZEL et al. (6) fanden eine Neutralprotease auf der Oberfläche von Lymphozyten, die nicht in das Medium abgegeben wurde und nicht durch TLCK gehemmt werden konnte. TLCK inhibierte dagegen die PHA-Stimulation sowie 25% der gesamten proteolytischen Aktivität der humanen Blutlymphozyten (PBL), darunter Cathepsin D, eine Neutralprotease und wahrscheinlich eine Thiolprotease. *Nach PHA-Stimulation* konnte jedoch kein Anstieg der proteolytischen Aktivität der Lymphozyten festgestellt werden (6).

Eine oberflächenassoziierte proteolytische Aktivität auf Maus T- und B-Lymphozyten wurde von TÖKES und KIEFER (7) gemessen. *Nach Mitogenstimulation* beobachtete TÖKES jedoch nur einen kurzfristigen Anstieg der proteolytischen Aktivität der Oberflächenenzyme (8). BATA et al. (9) fanden sowohl eine an die Oberfläche gebundene als auch eine in das Medium abgegebene proteolytische Aktivität von humanen PBL und Tonsillen-Lymphozyten, die sich durch α -1-Antitrypsin vollständig hemmen ließ.

Proteasen wurden auch auf der Oberfläche von humanen Blut-Monozyten (10) bzw. glasadhärenten Leukozyten (11) nachgewiesen. Im Gegensatz zu Lymphozyten reagierten die glasadhärenten Leukozyten auf eine *Mitogenstimulation* mit einem deutlichen Anstieg der oberflächenassoziierten proteolytischen Aktivität (11). Die Autoren sehen in ihren Ergebnissen einen Hinweis darauf, daß die oberflächenassoziierte proteolytische Aktivität der adhären-ten Leukozyten für deren akzessorische Funktion bei der mitogenen T-Zell-Stimulierung von Bedeutung ist (11).

BINDUNG VON PROTEASEHEMMERN: Einen indirekten Hinweis auf die Anwesenheit von Proteasen auf der Oberfläche von Lymphozyten gibt die Bindung von Proteasehemmern. Z.B. wurde gezeigt, daß sich Trasylol an humane PBL und Granulozyten (12) und α -1-AT an humane Lymphozyten (13) binden. Die Bindung von fluoreszinmarkierten α -1-AT Antikörpern soll einen Hinweis auf die Anwesenheit von α -1-AT auf ConA-stimulierten Lymphozyten geben (14). Auf der Lymphozytenoberfläche nachgewiesen worden ist auch α -2-Makroglobulin (15, 16).

SEKRETION VON PROTEASEN BZW. IN DAS MEDIUM ABGEGEBENE PROTEOLYTISCHE AKTIVITÄTEN: Neben oberflächengebundenen Proteasen sind auch von Lymphozyten in das Medium abgegebene proteolytische Aktivitäten nachgewiesen worden (9). Bekannt für die Sekretion von Proteasen sind vor allem *Makrophagen* (Neutralproteasen: Plasminogen Aktivator, Collagenase, Elastase und Angiotensin-Convertase). Makrophagen geben jedoch noch zahlreiche andere Stoffe ab: z.B. Proteasehemmer (Plasmininhibitor und α -2-Makroglobulin), Komplementkomponenten, reaktive Sauerstoffmetaboliten und Faktoren, die die Proliferation von Lymphozyten (aber auch anderer Zellen) sowohl fördern als auch hemmen (17). In diesem Zusammenhang soll darauf hingewiesen werden, daß Makrophagen innerhalb der *Immunregulation* eine bedeutende Rolle spielen. Z.B. sind Makrophagen als "accessory cells" für die Aufrechterhaltung der T-Zell-Aktivierung mit ConA nötig (18, 19). Sie können die B- und T-Zell-Stimulation durch Mitogene sowohl steigern als auch hemmen (20, 21).

EINFLUSS VON PROTEASEN UND PROTEASEHEMMERN AUF DIE STIMULATION VON LYMPHOZYTEN: Eine Beteiligung proteolytischer Aktivitäten an der Lymphozytenaktivierung wird von Experimenten nahegelegt, die einerseits eine Steigerung der Lymphozytenstimulation durch Proteasen, andererseits eine Inhibition der Lymphozytenstimulation durch Proteasehemmer zeigen.

So wurde gezeigt, daß die Proteasen Trypsin und Papain in der Lage sind, die in vitro-Antikörperbildung von Hamster-Lymphozyten gegen Schafserythrozyten zu steigern (22).

Die Behandlung von unstimulierten Maus-Milz-Lymphozyten und humanen PBL mit Trypsin führte zu einer Steigerung der ^3H -Thymidinaufnahme in die DNA der Lymphozyten (23). Stimulierend wirken auch Plasmin, Chymotrypsin, Thrombin, Pronase und Elastase (24). Trypsin steigerte auch den ^3H -Thymidineinbau von LPS-stimulierten Hamster-Lymphozyten (25). Außer im Falle von Pronase wird der stimulierende Effekt der Proteasen im allgemeinen auf eine B-Zell-Stimulation zurückgeführt (5).

Auf der anderen Seite wurde gefunden, daß sowohl natürliche als auch synthetische Proteasehemmer die mitogen-induzierte Stimulation von Lymphozyten inhibieren. Die durch verschiedene Mitogene induzierte Proliferation von Lymphozyten verschiedener Spezies wurde von α -1-AT und α -2-Makroglobulin gehemmt (5).

DARZYNKIEWICZ und ARNASON fanden neben einer Hemmung der DNA-Synthese eine Suppression des ^3H -UdR-Einbaus in die RNA von unstimulierten und PWM/PHA-stimulierten humanen Lymphozyten durch die synthetischen Proteasehemmer TPCK, TLCK, BTEE und TAME (26).

Eine Übersicht über den Einfluß verschiedener Proteasehemmer auf die Stimulation von MMZ durch verschiedene Mitogene gibt VISCHER (27).

HART und STREILEIN fanden eine Inhibition der ConA- und LPS-Stimulation von Hamster-Lymphozyten durch TPCK und TLCK, jedoch keine Hemmung der mitogenen Stimulation durch PMSF und EACA (28). Keinen Effekt von DFP auf die ConA-induzierte (T-)Lymphozytenstimulation fanden KU et al. (29), jedoch eine Hemmung der Lymphozytenstimulation bei verschiedenen B-Zell-Mitogenen. Einen steigernden

Effekt von SBTI auf die mitogene Stimulation von Hamster Lymphozyten, einen inhibierenden Effekt dagegen bei Maus-Lymphozyten zeigte HART (30).

Da Protease/Proteasehemmer-Systeme offensichtlich bei der Regulation von Lymphozytenaktivitäten eine wichtige Rolle spielen, haben wir den Einfluß von *Proteasehemmern* auf die ConA-Stimulation von MMZ näher untersucht. Diese Aufgabenstellung für die vorliegende Arbeit hatte sich aus experimentell gewonnenen Ergebnissen entwickelt, die in Kapitel 3.1. beschrieben sind. Uns interessierte aber auch der Einfluß verschiedener *Alkohole* auf die ConA-Stimulation, da wir festgestellt hatten, daß 2-Propanol, das wir anfangs als Lösungsmittel für den lipophilen Proteasehemmer PMSF verwendet hatten, für sich alleine bereits einen steigernden Effekt auf die ConA-Stimulation hatte.

EINFLUSS VERSCHIEDENER ALKOHOLE AUF DIE STIMULATION VON LYMPHOZYTEN: Aus klinischer Erfahrung bekannt sind vor allem die toxischen Wirkungen des *Äthylalkohols*, die u.a. auch das Knochenmark betreffen und zu einer Immunsuppression führen können (31, 32, 33). Auch experimentell ist ein toxischer Effekt des Äthanol auf Lymphozyten nachgewiesen worden (34). Eine Suppression der PHA und Streptolysin-O induzierten Lymphozytentransformation durch Äthanol fanden TISMAN und HERBERT (33). ATKINSON et al. (35) beobachteten eine Inhibition der PHA-Stimulation durch Äthanol, jedoch keine Hemmung der ConA-Antwort. Auch andere Alkohole, die von diesen Autoren getestet worden waren, inhibierten die PHA-Stimulation humaner Lympho-

zyten, während Phenyläthylalkohol bei suboptimaler PHA Konzentration auch zu einer Stimulation führte.

Die immunsuppressive Wirkung des Äthanol wird auch darauf zurückgeführt, daß Äthanol zahlreiche Funktionen von Makrophagen inhibiert, wie z.B. Adhärenz und Phagozytose (36), Sekretion lysosomaler Enzyme (35) und Chemotaxis (37).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Äthanol, p.a.	Karl Roth, Karlsruhe
Äthylenglykoll, p.a.	Karl Roth, Karlsruhe
Azeton, p.a.	Merck, Darmstadt
α -1-Antitrypsin	Sigma Chemie, München
Bovines Serum Albumin	Boehringer, Mannheim
Carbonyleisen	GAF Ltd., Manchester, England
Concanavalin A (ConA)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Di-isopropylfluorophosphat (DFP)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Fetales Kälberserum Lot Nr. 65 78 60	Boehringer, Mannheim
Ficoll-Paques	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Fungizone ^R , 250 µg/ml	Flow Laboratories GmbH, Bonn 3
L-Glutamin, 200 mM	Flow Laboratories GmbH, Bonn 3
10x Hanks Balanced salt solution (modified) with- out sodium bicarbonate	Flow Laboratories GmbH, Bonn 3
Katalase	Boehringer, Mannheim

3. Komplementkomponente Lot Nr. 205 29	Cordis Laboratories, Miami, Florida
2-Mercaptoäthanol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn bei München
[Methyl- ³ H]-Thymidine spezifische Aktivität 5 Ci/mmol	Amersham Buchler, Braunschweig
10x Minimum Essential Me- dium, MEM, (modified) mit Earle-Salzen (EBSS) ohne L-Glutamin, ohne Natriumbi- karbonat	Flow Laboratories GmbH, Bonn 3
N- α -tosyl-l-lysyl-l-chloro- methylketone (TLCK)	Merck, Darmstadt
N-2-hydroxyethylpiperazine N'-2-ethan-sulfonic-acid (HEPES), 20 mM	Flow Laboratories GmbH, Bonn 3
100x Non-Essential Amino Acids	Flow Laboratories GmbH, Bonn 3
Penicillin-Streptomycin 5000 I.U./ml - 5000 μ g/ml	Flow Laboratories GmbH, Bonn 3
1-Propanol, p.a.	Merck, Darmstadt
2-Propanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Ribonuklease A	Boehringer, Mannheim
Rotiszint ^R 11	Karl Roth, Karlsruhe

R 4	Dieses Reagenz wurde im Labor von Prof. Dierich hergestellt. Meerschweinchenserum wurde für 30 min bei 37 °C mit Hydrazinlösung inkubiert (0,25 ml 0,16 m Hydrazinlösung/ml Serum)
Silikonöl "Bayer" M, Typ H	Mainland Pharmazeutische Fabrik GmbH, Frankfurt/Main
Sojabohnen-Trypsininhibitor (SBTI), 35 Einheiten/mg	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Sodium Bicarbonate, 7,5 %	Flow Laboratories GmbH, Bonn 3
Sodium Pyruvate 100 mM	Flow Laboratories GmbH, Bonn 3
Trasylol	Bayer, Leverkusen
Trypanblau in 0,9 %iger NaCl-Lösung	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Trypsin	Serva Feinbiochemica, Heidelberg

2.2. SONSTIGE MATERIALIEN, GERÄTE UND MASCHINEN

Homogenisatorgefäße (5 ml) mit eingeschliffenem Glaskolben	B. Braun AG, Melsungen
Eppendorfpipetten (5-1000 µl)	Netheler und Hinz GmbH, Hamburg
Dosierspritze (20 µl)	Hamilton Company, Bonaduz Schweiz

Mikrotiterplatten, F-Form, ober- C.A. Greiner, Nürtingen
flächenbeschichtet, steril

Filter zur Sterilfiltration, Millipore, Molsheim
Porengröße 0,45 µm Frankreich

Erntegerät für Mikrotiter- Skatron AS, Lierbryen, Nor-
platten wegen, über Flow Laboratories
GmbH, Bonn 3

Liquid Scintillation Spectro- Packard Instrument GmbH,
meter TRI-CARB Subsidiary of Ambac Indus-
tries Inc., Frankfurt/Main

Sephadex G 10 Säule Pharmacia, Uppsala, Schweden

Sephadex G 100 Säule Pharmacia, Uppsala, Schweden

STERILISATION DER GEFÄSSE: Alle mit Zellsuspension oder
Kulturflüssigkeit in Berührung kommenden Gefäße und Ge-
räte wurden vor Gebrauch hitzesterilisiert oder auto-
klaviert.

SILIKONISIERUNG DER GLASOBERFLÄCHEN: Alle mit Zellsuspension
in Kontakt kommenden Glasoberflächen wurden vor dem Hitze-
sterilisieren bzw. Autoklavieren silikonisiert (20 min in
1 %iger Silikonöl-Emulsion).

2.3. VERSUCHSTIERE: MÄUSE

Mausmilzzellen, Mausthymozyten und Maus-periphere Blutzellen wurden aus Balb/c Mäusen gewonnen. Die Tiere wurden vom Zentralinstitut für Versuchstiere (Hannover) bezogen oder stammten aus der eigenen Zucht des Labors von Prof. Dierich. Zur Gewinnung von Milzzellen und peripheren Blutzellen wurden Mäuse im Alter von 2-3 Monaten verwendet. Thymozyten wurden aus 7-8 Wochen alten Balb/c Mäusen gewonnen.

2.4. HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN

STERILFILTRATION DER LÖSUNGEN: Alle Lösungen, in denen Zellen suspendiert wurden bzw. gelöste Reagenzien, die Zellkulturen zugesetzt wurden, wurden - sofern nicht bereits steril erhältlich - mit Milliporefiltern (Porengröße 0,45 µm) sterilfiltriert.

2.4.1. Puffer

PBS-Puffer

Ansatz: 11,5 ml 0,2M NaH_2PO_4
 + 38,5 ml 0,2M NaH_2HPO_4
 + 7,4 g NaCl
 ad 1 Liter mit Aqua dest. aufgefüllt und
 auf pH 7,3 eingestellt.

VBS-Saccharose-Puffer

Ansatz der Stammlösung:	88,3 g NaCl	
	10,19 g Na-5,5-Diäthyl-barbiturat	
	34,58 ml 1n HCl	
	Aqua dest. ad 2000,0 ml	
VBS-Saccharose-Puffer:	1,5 g Gelatine	
	Saccharose Stammlösung	240 ml
	VBS-Stammlösung	160 ml
	CaCl ₂ -Lösung 0,3 m	1 ml
	MgCl ₂ -Lösung 2,0 m	1 ml
	Aqua dest. ad	2000,0 ml
	(pH 7,3 - K 6,5)	

2.4.2. Kulturmedium

Das Kulturmedium wurde aus steril erhältlichen Lösungen angesetzt. Für die Präparation der Zellen wurde vorwiegend das 10x Hank's Balanced Salt Medium (HM) verwandt, während für die Kultivierung das 10x Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle-Salzen benutzt wurde. Zugesezt wurden dem MEM folgende Substanzen:

- 1% nicht-essentielle Aminosäuren
- 1% Na-pyruvat 100 mM
- 1% L-Glutamin 200 mM
- 2% Penicillin-Streptomycin
- 1‰ Fungizone^R
- 0,1 mM Mercapthoäthanol
- 2% HEPES-Puffer

Der pH-Wert wurde durch Zusatz von ca. 40-50 ml/Liter 7,5 %igem Bikarbonat zwischen 7 und 7,2 eingestellt.

Durch Abgabe von CO_2 an die Luft hatte das Medium am Ende der Mikrotiterplattenfüllung pH-Werte im gewünschten Bereich von 7,4. Die K-Werte lagen bei Temperaturen um 30 °C zwischen 14 und 15 K.

FCS: Für die Zellkultivierung wurde dem Medium ferner hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) bis zu einer Endkonzentration von 7 % zugegeben. Die Hitzeinaktivierung des FCS erfolgte im Wasserbad bei 56 °C für 60 Minuten.

2.4.3. Concanavalin A (ConA)

ConA wurde mit physiologischer NaCl-Lösung auf eine Konzentration von 0,125 mg ConA/ml eingestellt und nach Sterilfiltration bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

2.4.4. Proteasehemmer (PH)

PMSF wurde in 1-Propanol gelöst, mit 1-Propanol auf eine Konzentration von 115 mM eingestellt, sterilfiltriert und durch Zusatz von MEM auf die gewünschte Konzentration gebracht. SBTI und TLCK wurden in MEM gelöst. SBTI, DFP und TLCK wurden nach Sterilfiltration mit MEM auf die gewünschte Konzentration gebracht. Alle Verdünnungen der Proteasehemmer (PH) wurden für jedes Experiment neu hergestellt.

2.4.5. Alkohole

Die Alkohole Äthanol, Äthylenglykoll, Isopropanol, Propanol und Azeton wurden sterilfiltriert und durch Zugabe von MEM auf die gewünschte Konzentration gebracht. Alle Verdünnungen der Alkohole wurden für jedes Experiment neu hergestellt.

2.5. GEWINNUNG DER ZELLEN

MAUSMILZZELLEN (MMZ): Die Präparation der Zellen erfolgte unter sterilen Kautelen im Laminar Air Flow. Den durch Durchreißung der Medulla oblongata getöteten Tieren wurde das Fell vom gesamten Bauch- und Brustraum abgezogen. Die freiliegende Bauchdecke wurde im linken oberen Quadranten mit 70 %igem Alkohol bespritzt und eingeschnitten. Mit Schere und Pinzette wurde die Milz aus dem Bauchraum entfernt und möglichst vollständig vom Bindegewebe befreit. In Homogenisatorgefäßen, die mit 5 ml HM angefüllt waren und je Gefäß 2-4 Milzen enthielten, wurden die Milzen mittels exakt eingepaßter Kolben zerkleinert. Zur Dämpfung des Zellstoffwechsels wurden die Gefäße auf Eis gestellt. Über dem Kolben der Homogenisatorgefäße befand sich die Milzzell-Suspension, die durch Zentrifugieren mit 3000 U/min (1400 g) über 5 Minuten bei 4 °C mit HM gewaschen wurde. Je 5 ml Milzzell-Suspension wurden dann in einem Reagenzglas, das 4 ml Ficoll-Paque enthielt, vorsichtig mit Hilfe von Pasteurpipetten auf den Ficoll-Gradienten geschichtet. Die Trennung erfolgte

mit 2400 U/min (900 g) über 30 Minuten bei 4 °C. Der nach der Trennzentrifugation auf dem Ficoll-Paque-Gradienten erkennbare Lymphozytenring wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in ein konisches Zentrifugenröhrchen gespritzt. Nach Zentrifugieren mit 3000 U/min über 5 Minuten bei 4 °C wurden die Zellen zweimal mit HM gewaschen und danach in MEM resuspendiert. Die gewünschte Lymphozytenkonzentration wurde nach Auszählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer durch Verdünnung mit MEM eingestellt und erneut kontrolliert.

MAUSTHYMOZYTEN (MTHY): Den getöteten Mäusen wurde unter sterilen Bedingungen der Brustkorb beidseits lateral aufgeschnitten und das Sternum hochgeklappt. Danach wurde der Thymus mit Schere und Pinzette möglichst ohne Eröffnung des Herzens stumpf präpariert, losgelöst und von möglichst allen Lymphknoten befreit. Die gewonnenen Thymi wurden in HM gewaschen und in Homogenisatorgefäßen zerkleinert. Die Thymozytensuspension wurde zweimal in HM gewaschen (3000 U/min, 5 Minuten), danach in MEM aufgenommen und auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt.

MAUS-PERIPHERE-BLUT-LYMPHOZYTEN (MPBL): Peripheres Blut wurde von narkotisierten Mäusen mittels Herz-Punktion gewonnen. Die Trennung der Lymphozyten erfolgte wie oben beschrieben auf dem Ficoll-Paque-Gradienten.

Der Anteil der vitalen Zellen wurde durch Färbung mit

Trypanblau (s.u.) ermittelt. Die gewonnenen MMZ und MTHY bestanden nach der Trennung zu 90 %, die MPBL zu 95 % aus lebenden Zellen.

2.6. ZELLKULTIVIERUNG

Für die Kultivierung wurden Mikrotiterplatten mit flachem Boden und mit Deckel verwendet. Von jeder Test-Variante wurden zumeist vier Wiederholungen angelegt. Die Ansätze einer Fragestellung wurden dreimal wiederholt. Wenn nicht anders angegeben, enthalten die Abbildungen die Mittelwerte von drei Experimenten.

Das Endvolumen der Löcher einer Mikrotiterplatte betrug stets 300 μ l. Das Volumen setzte sich zusammen aus 200 μ l Zellsuspension ($\approx$ 5 Millionen Zellen/ml), 20 μ l FCS, 20 μ l ConA, 30 μ l PH- bzw. Alkohol-Verdünnung und 30 μ l MEM, daraus ergab sich eine Zellkonzentration von 3×10^6 Zellen/ml Kulturflüssigkeit. Alle Kulturen enthielten somit 7 % FCS und 7,5 μ g ConA/ml Kulturflüssigkeit vom Beginn der Kultivierung an. Die PH (bzw. Alkohole) wurden den Zellen zu Beginn der Kultivierung wie angegeben zugesetzt - in den Diagrammen ist jeweils die resultierende Endkonzentration der PH (bzw. Alkohole) in der Kulturflüssigkeit angegeben.

Die MTP wurden unter sterilen Bedingungen mit Eppendorfpipetten im Laminar Air Flow beschickt. Der fertige Ansatz kam bei geschlossenem Deckel 48 Stunden in den Brutschrank, wo er bei +37 °C und einer 5-7 %igen CO₂-Atmos-

phäre bebrütet wurde. Vier Stunden vor Ablauf der Kulturzeit erhielt jedes Loch der MTP $20 \mu\text{l} = 0,5 \mu\text{Ci } ^3\text{H-Thymin}$. Nach Ablauf der vier Stunden wurden die Zellen mit dem Skatron A.S. Erntegerät geerntet.

2.7. "ERNTE" DER ZELLEN - MESSUNG DES EINBAUS ^3H -MARKIERTEN THYMIDINS IN DIE DNA

ERNTE DER ZELLEN: Das Glasfaserfilterblatt wurde in das Skatron-Erntegerät eingespannt. In einer leeren MTP wurde 5 sec mit Aqua dest. und 10 sec mit Luft "vorgespült", danach die 1. Reihe der vollen MTP 15 sec lang abgesaugt. Anschließend wurde 10 sec mit H_2O gespült und solange Luft nachgesaugt, bis kein Wasser mehr in die Abwasserflasche tropfte, d.h. bis der eingespannte Filter gut vorgetrocknet war. Danach wurde die Ernte der folgenden Reihen auf die gleiche Weise durchgeführt. Nach Absaugen sämtlicher MTP-Reihen wurde das Filterpapier in einem Trockenschrank vollständig getrocknet.

MESSUNG DER IM FILTERPAPIER ZURÜCKGEHALTENEN RADIOAKTIVITÄT:

Auf der Glasfaserfilterplatte entsprach jedes Plättchen einem MTP-Loch. Die Filterplättchen wurden mit einer Pinzette herausgelöst und jedes Plättchen in je ein Plastikgefäß gegeben. In jedes Gefäß wurde mit einer Dosierspritze je 2 ml Rotiszint^R 11 gefüllt. Die Gefäße wurden mit Deckeln versehen, markiert und auf 4°C gekühlt. Daraufhin wurden die Proben in das Liquid Scin-

tillation Spectrometer der Fa. Packard gestellt, das für jede Probe die Messung der ^3H -Thymidinaufnahme vornahm und die gezählten Impulse in counts/min ausdrückte.

BERECHNUNG DES STIMULATIONSINDEX: Der Stimulationsindex wurde aus den Einbauraten ^3H -markierten Thymidins in die DNA ConA + PH stimulierter MMZ folgendermaßen berechnet:

$$\text{Index} = \frac{\text{Mittelwert der Impulse pro Minute (IPM) von zwei bis vier Kulturen, die ConA + PH enthielten}}{\text{Mittelwert der Impulse pro Minute (IPM) von zwei bis vier Kulturen, die nur ConA enthielten}}$$

2.8. EXPERIMENTE MIT DER 3. KOMPLEMENTKOMPONENTE (C3)

TRYPSINSPALTUNG: Die Trypsinspaltung der C3-Präparation (Cordis) erfolgte nach Dialyse gegen MEM für 24 Stunden bei 4 °C. Trypsin wurde zusammen mit C3 in einem Verhältnis von 1 µg Trypsin/0,1 mg C3/ml bei 37 °C für 1 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 mM DFP (im Endvolumen) abgestoppt.

TESTUNG VON SEPHADEX G 100 FRAKTIONEN DER C3-PRÄPARATION: Die *Fraktionierung des Cordis C3* (Lot Nr. 205 29) erfolgte durch Chromatographie mittels einer Sephadex G 100 Säule. 500 µg C3/2 ml wurden auf die Säule aufgetragen. Als Puffer wurde PBS verwendet. Das Eluat wurde in vier Fraktionen (1. Fraktion: vor C3; 2. Fraktion: C3; 3. Fraktion: unbekannte Substanz; 4. Fraktion: Eluat

nach der unbekannten Substanz) aufgeteilt, die mit Kolloidumhülsen 1:10 ankonzentriert und dann sterilfiltriert wurden. Daraufhin wurden die einzelnen Fraktionen im *Lymphozytenstimulationstest* geprüft: Messung des ^3H -Thymidineinbaus von 3×10^6 MMZ/ml Kulturflüssigkeit, die in Anwesenheit von 7,5 μg ConA/ml Kulturflüssigkeit und verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Fraktionen für 48 Stunden kultiviert worden waren.

MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG: Folgende Referenzproteine wurden zusammen mit der 3. Fraktion auf eine Sephadex G 100 Chromatographiesäule aufgetragen:

Ribonuklease A (MG 13 700)

Albumin aus Rinderserum (MG 68 000)

Katalase (MG 240 000)

Als Puffer wurde PBS verwendet. Nach Aufstellung des Elutionsdiagramms wurde das Molekulargewicht (MG) rechnerisch ermittelt (41).

TESTUNG DES EINFLUSSES DER 3. FRAKTION AUF DIE KOMPLEMENT-ABHÄNGIGE ZYTOLYSE:

- | | |
|--------------------|--|
| 50 μl | EAC 14°2 (entsprechend $1,3 \times 10^8$ Zellen in VBS-S) |
| + 25 μl | 1:320 verdünntes C3 aus eigener Herstellung (42) |
| + 25 μl | der 3. Fraktion (konzentriert sowie in verschiedenen Verdünnungen) |
| + 25 μl | 1:200 verdünntes R 4 |

wurden zusammen bei 37 °C während 30 Minuten inkubiert.

Danach wurden jeder dieser Proben 100 μ l VBS-S zugefügt. Die optische Dichte der Proben wurde in einer Mikroküvette bei einer Wellenlänge von 420 nm im Eppendorf-Photometer gemessen.

2.9. BEOBACHTUNG DER VITALITÄT DER ZELLEN

Die Vitalität der Zellen wurde mit der Trypanblau-Färbung ermittelt. Trypanblau wurde als 0,4 %ige Lösung in HM angesetzt bei einem pH von 7,2. Methyl-p-hydroxybenzoat wurde nicht hinzugefügt (38).

Die Zellkonzentration zur Färbung betrug $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml. Pro ml Zellsuspension wurden 0,1 ml der 0,4 %igen Trypanblaulösung zugefügt.

Um den Einfluß der PH DFP und SBTI (bzw. der Alkohole 2-Propanol und Äthanol) auf die Lebensfähigkeit der Milzzellen zu prüfen, wurde die Trypanblau-Färbung nach der entsprechenden Kultivierung durchgeführt. 3×10^6 MMZ/ml wurden zusammen mit 7,5 μ g ConA/ml als Kontrolle und 7,5 μ g ConA/ml *plus* DFP + SBTI (bzw. 2-Propanol und Äthanol) in verschiedenen Konzentrationen für 48 Stunden kultiviert. Nach Ablauf der Kulturzeit wurden die Zellen im Kulturmedium resuspendiert und die Farblösung zugeetzt (30 μ l pro well). Nach fünfminütiger Einwirkung der Farblösung wurde der Anteil der vitalen, nicht blau gefärbten Zellen in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und in Prozent in der Abbildung angegeben.

2.9. BEOBACHTUNG DES AGGREGATIONSVERHALTENS

Jeweils gleiche Zellzahlen (3×10^6 Zellen/ml Kulturflüssigkeit) wurden zusammen mit 7,5 µg ConA/ml als Kontrolle und zusammen mit 7,5 µg ConA/ml *plus* verschiedene Mengen an PH bzw. Alkoholen für 48 Stunden kultiviert. Nach Ablauf der Kulturzeit wurden die Zellen vorsichtig, um bestehende Aggregate nicht zu zerstören, im Kulturmedium resuspendiert. Daraufhin wurden die einzelnen, nicht aggregierten Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt und daraus der Prozentsatz der aggregierten Zellen berechnet.

2.11. ENTFERNUNG UND ANREICHERUNG DER MONOZYTEN/MAKROPHAGEN

Der Prozentsatz an Monozyten/Makrophagen wurde mit der unspezifische-Esterase-Färbung ermittelt, deren Methode von TUCKER und Mitarbeitern beschrieben wurde (39).

MMZ enthielten 1-2 %, MTHY 6-9 % und H^7B_1 15-20 % unspezifische Esterase-positive Zellen.

ENTFERNUNG DER ADHÄRIERENDEN UND PHAGOZYTIERENDEN ZELLEN:
 30×10^6 MMZ, die in 5 ml MEM suspendiert waren, wurden in sterilen Plastikröhrchen bei 37 °C während 30 Minuten mit Carbonyleisen inkubiert. Die Inkubation erfolgte unter kontinuierlichem langsamen Rütteln nach der Methode von RUMPOLD et al. (40). Nach Ablauf der Inkubation wurde die

Zellsuspension über einem starken Magneten ausgegossen, um auf diese Weise all jene Monozyten/Makrophagen zurückzuhalten, die Carbonyleisenpartikel phagozytiert hatten. Nach dieser Behandlung mit Carbonyleisen waren in der Zellsuspension keine Esterase-positiven Zellen mehr enthalten. Dennoch ließen sich die so behandelten MMZ mit ConA ebenso gut stimulieren, wie unbehandelte MMZ. Eine weitere Entfernung adhätierender Zellen wurde mit Hilfe einer Sephadex G 10 Säule nach der Methode von HABU und RAFF (18) vorgenommen. 4 ml autoklaviertes Sephadex G 10 Gel wurde in eine 10 ml Säule gefüllt und gründlich mit MEM gewaschen. Danach wurden die MMZ (2×10^7 Zellen/ml) bei Zimmertemperatur auf das Sephadex G 10 Gel aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die nicht adhätierten Zellen mit dem Eluat aufgefangen. Nach Ablauf dieser Behandlung waren 95-98 % der Zellen nach der Trypanblau-Färbung als vital anzusehen.

ANREICHERUNG ADHÄRIERENDER ZELLEN: 3×10^6 MMZ, die in 0,2 ml MEM (FCS-haltig) suspendiert waren, wurden im Brutschrank für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Während dieser Zeit sollten die Monozyten/Makrophagen auf dem flachen Boden der Mikrotiterplatte adhätieren. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Überstände abgegossen und die adhätierten Zellen zweimal mit MEM gewaschen.

3. ERGEBNISSE

3.1. ERFAHRUNGEN MIT EINER PRÄPARATION DER 3. KOMPLEMENT-KOMPONENTE (C3) ALS HINFÜHRUNG ZU DEN ERGEBNISSEN MIT PROTEASEHEMMERN

3.1.1. "Cordis-C3" steigert die Stimulierung von MMZ durch ConA

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit hatte das Hauptinteresse darin bestanden, den Einfluß der 3. Komplementkomponente (C3) auf die ConA-Stimulierung von MMZ zu untersuchen.

Die mit diesem Ziel durchgeführten Experimente hatten gezeigt, daß der ^3H -Thymidineinbau in die DNA ConA-stimulierter MMZ durch Zugabe einer C3-Präparation gesteigert werden konnte. Diese Steigerung des ^3H -Thymidineinbaus ConA-stimulierter MMZ wurde mit einer Dosis von 6-8 μg "Cordis-C3"/ml bei ConA-Konzentrationen von 5-12,5 μg ConA/ml Kulturflüssigkeit beobachtet (Abb. 1). Die Abbildung zeigt, daß die Zugabe von "Cordis-C3" eine Steigerung der ^3H -Thymidinaufnahme in MMZ bei optimal stimulierenden ConA-Konzentrationen verursachte.

Sowohl die Basis-Stimulation der MMZ durch ConA als auch die Steigerung der ConA-Stimulation durch "Cordis-C3" erwiesen sich als abhängig von der Zellkonzentration in der MMZ-Suspension (Abb. 2). Eine optimale ConA-Basis Stimulation wurde bei einer Zellkonzentration von ca. 3×10^6 MMZ/ml Kulturflüssigkeit beobachtet.

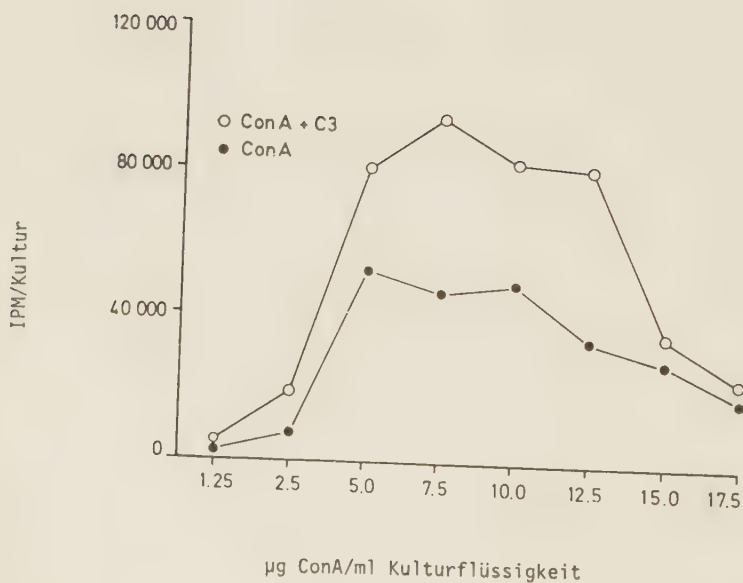


Abb. 1: Einfluß von "Cordis-C3" auf den ConA-induzierten ^3H -Thymidineinbau von MMZ bei verschiedenen ConA-Konzentrationen

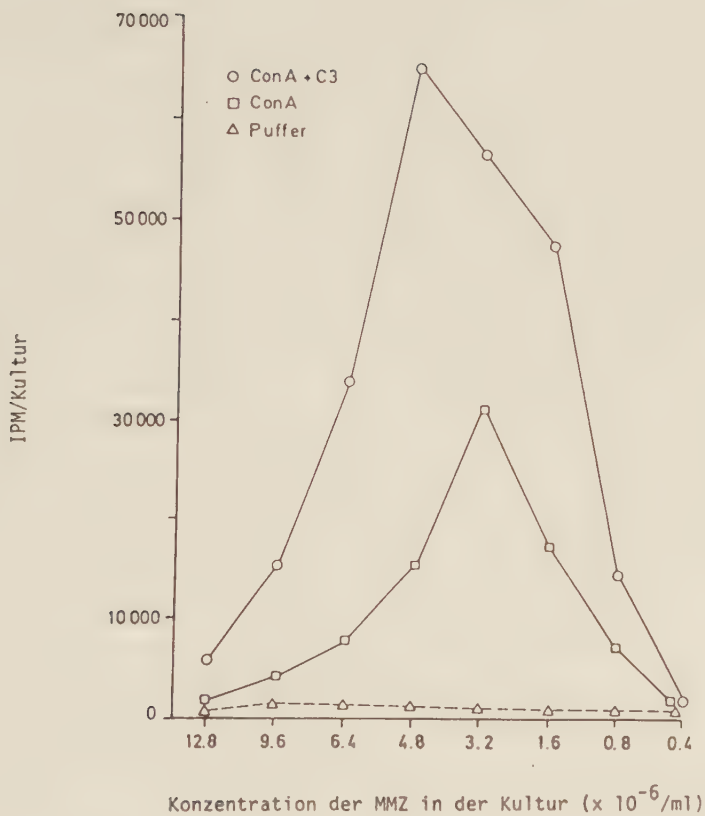


Abb. 2: Abhängigkeit der ConA-Stimulation und des "Cordis-C3"-Effektes von der MMZ-Konzentration in der Kultur

Die Beobachtung, daß die ConA-Antwort durch die "3. Komponentekomponente" gesteigert werden konnte, wurde zum Ausgangspunkt für weitere Experimente, die den Wirkmechanismus des "C3-Effekts" klären sollten. Daß dieser Effekt jedoch *nicht mehr* auf das C3-Molekül zurückgeführt werden kann, muß hier betont werden. Im folgenden Abschnitt soll dies begründet werden. Dabei soll auch deutlich werden, warum sich unser Interesse bald darauf richtete, den Einfluß von definierten *Proteasehemmern* auf die ConA-Stimulation zu untersuchen.

3.1.2. Testung von Sephadex G-100 Fraktionen der C3-Präparation

Uns interessierte, ob der oben beschriebene "C3-Effekt" durch das native C3-Molekül oder durch sein biologisch aktives Spaltprodukt C3b verursacht wurde. Deshalb wurde das Cordis-C3 mit Trypsin gespalten und seine Spaltprodukte mit Hilfe einer Sephadex G-100 Chromatographiesäule getrennt. Das so gewonnene C3b zeigte im Lymphozytenstimulationstest keinen Einfluß auf den ConA-induzierten ^3H -Thymidineinbau von MMZ. Zur Kontrolle dieses Versuchs war auch das ungespaltene Cordis-C3 mit der Sephadex G-100 Säule chromatographiert worden. Die Testung der einzelnen Fraktionen des Cordis-C3 im Lymphozytenstimulationstest (siehe 2.8.) ergab, daß *nicht* die 2. Fraktion, die das C3 enthielt, sondern die 3. Fraktion, die eine unbekannte Substanz enthielt, die Steigerung des ConA-induzierten ^3H -Thymidineinbaus hervorrief. Das chromatographierte C3 zeigte dabei vollständige Lyse-

aktivität (Abb. 3). Die Steigerung der ConA-Antwort konnten wir auch dann beobachten, wenn wir anstelle der 3. Fraktion der C3-Präparation (bzw. des ungereinigten Cordis-C3) lediglich den Puffer der Cordis-C3 Präparation den ConA-stimulierten MMZ zusetzten.

3.1.3. Versuch, die aktive Substanz in der 3. Fraktion näher zu charakterisieren

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß nicht die 3. Komplementkomponente, sondern eine andere, noch unbekannte Substanz für die Steigerung der ConA-Antwort verantwortlich war, versuchten wir, diese Substanz näher zu charakterisieren.

MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG: Zunächst versuchten wir, das Molekulargewicht der aktiven Substanz zu bestimmen. Deshalb gaben wir Referenzproteine auf eine Sephadex G-100 Säule und berechneten für die aktive Substanz näherungsweise ein Molekulargewicht von 35 000.

DIE AKTIVE SUBSTANZ HEMMT DIE KOMPLEMENTABHÄNGIGE ZYTO-
LYSE ANTIKÖRPERBELADENER SCHAFSERYTHROZYTEN: Bei dem Versuch, C3b zu gewinnen, war aufgefallen, daß sich das Cordis-C3 nicht mit Trypsin spalten ließ. Die Trypsinspaltung war erst nach einer Dialyse des Cordis-C3 gegen MEM möglich. Dies nahmen wir bereits als einen Hinweis auf eine in der Cordis-C3-Präparation enthaltene Proteasehemmaktivität. Lyseteste wurden notwendig, um zu zeigen, daß C3 durch Trypsin gespalten und damit nicht mehr lyseaktiv war, chromatographiertes natives C3 jedoch noch

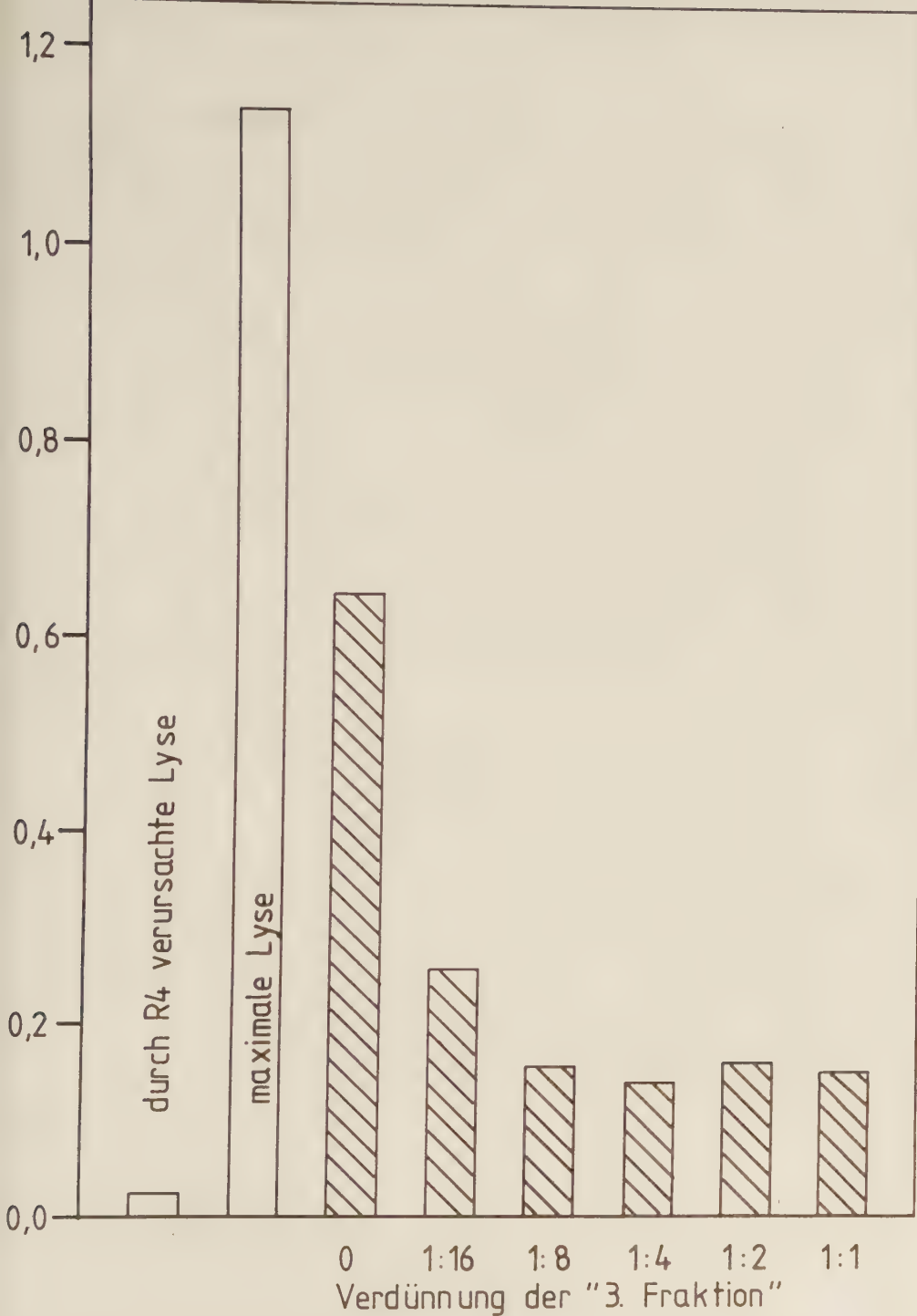


Abb. 4: Inhibition der komplementabhängigen Zytolyse antikörperbeladener Schafererythrozyten durch die 3. Fraktion der Cordis-C3-Präparation

Lyseaktivität aufwies. Innerhalb dieser Lyseteste zeigten Kontrollexperimente, daß auch die Anwesenheit der 3. Fraktion die komplementabhängige Zytolyse antikörperbeladener Schafserythrozyten verminderte. Die Hemmung der komplementabhängigen Zytolyse antikörperbeladener Schafserythrozyten durch die aktive Substanz (aus Cordis-Puffer hergestellt) zeigt Abb. 4. Das Ausmaß der Hämolyse wurde durch Messung des freigesetzten Hämoglobins bestimmt. In die Abbildung eingetragen ist die optische Dichte des Überstandes, die in Abhängigkeit von der Menge der 3. Fraktion im Testansatz bei einer Wellenlänge von 412 nm im Spektrophotometer gemessen wurde. Eine Zugabe verschiedener Mengen der 3. Fraktion führte zu einer Verminderung der freigesetzten Hämoglobinmenge im Vergleich zur Kontrollprobe, die anstelle der 3. Fraktion nur VBS-S enthielt.

Die Hemmung der komplementabhängigen Zytolyse faßten wir als einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Proteasehemmaktivität in der aktiven Substanz auf.

Da uns die Firma Cordis nicht angeben konnte, um welchen Proteasehemmer es sich in der C3-Präparation handelte, interessierte uns, ob bekannte, im Handel erhältliche PH wie DFP oder SBTI einen Einfluß auf die ConA-Stimulation haben würden. Derartige Substanzen zu verwenden, hätte den Vorteil, mit gut definierten Substanzen arbeiten zu können.

3.2. PROTEASEHEMMER

3.2.1. Einfluß der Proteasehemmer DFP, PMSF, TLCK und SBTI (α -1-AT und Trasylol) auf die Stimulierung von MMZ

Im folgenden sollte zum einen der Einfluß verschiedener PH auf die ConA-Stimulierung von MMZ untersucht, zum anderen die Frage geklärt werden, ob die PH selbst, d.h. auch ohne Mitogeneinwirkung einen stimulierenden Effekt zeigen würden. Deshalb wurden jeweils 3×10^6 MMZ/ml Kulturflüssigkeit sowohl in Anwesenheit von ConA (7,5 μ g/ml Kulturflüssigkeit) als auch ohne ConA zusammen mit verschiedenen Konzentrationen der PH DFP, PMSF, TLCK und SBTI kultiviert. Kontrollkulturen erhielten anstelle der PH-Verdünnung MEM.

Die Kultivierung geschah in der MTP bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre und dauerte 48 Stunden. Vier Stunden vor Ablauf der Kulturzeit erhielten die Kulturen 0,5 μ Ci ³H-markiertes Thymidin. Nach Ablauf der 48-stündigen Kulturzeit wurden die Zellen geerntet und die Einbauraten des ³H-Thymidins in die DNA der MMZ als Parameter für deren Stimulierung ermittelt. Es ergaben sich die in Abb. 5 dargestellten Dosis-Wirkungskurven, die die Abhängigkeit des ³H-Thymidineinbaus (in IPM) von der jeweiligen PH-Konzentration wiedergeben.

DI-ISOPROPYLFLUOROPHOSPHAT (DFP): DFP ist ein synthetischer Proteasehemmer, dessen inhibierende Wirkung durch Alkylierung von Serin im aktiven Zentrum von Serinproteasen erfolgt (43).

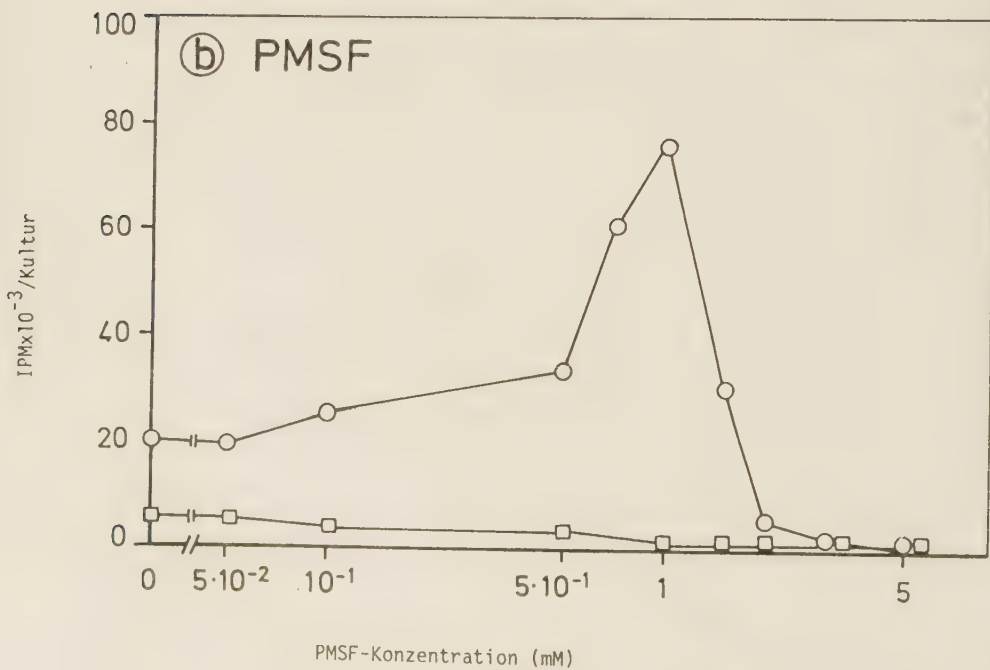
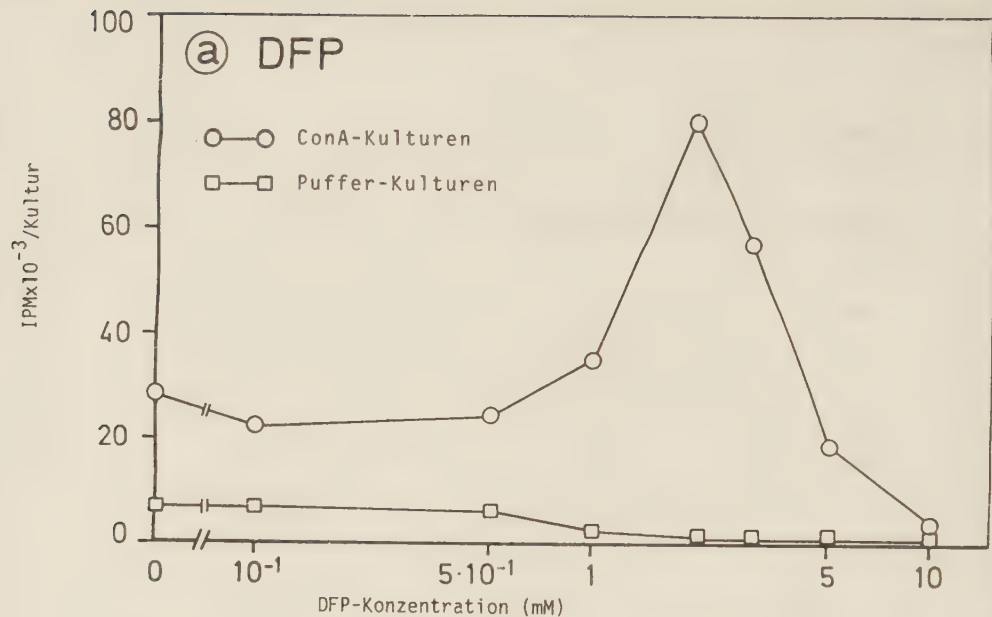


Abb. 5a+b: Einfluß der Proteasehemmer DFP und PMSF auf die Stimulierung von Maus-Milz-Zellen

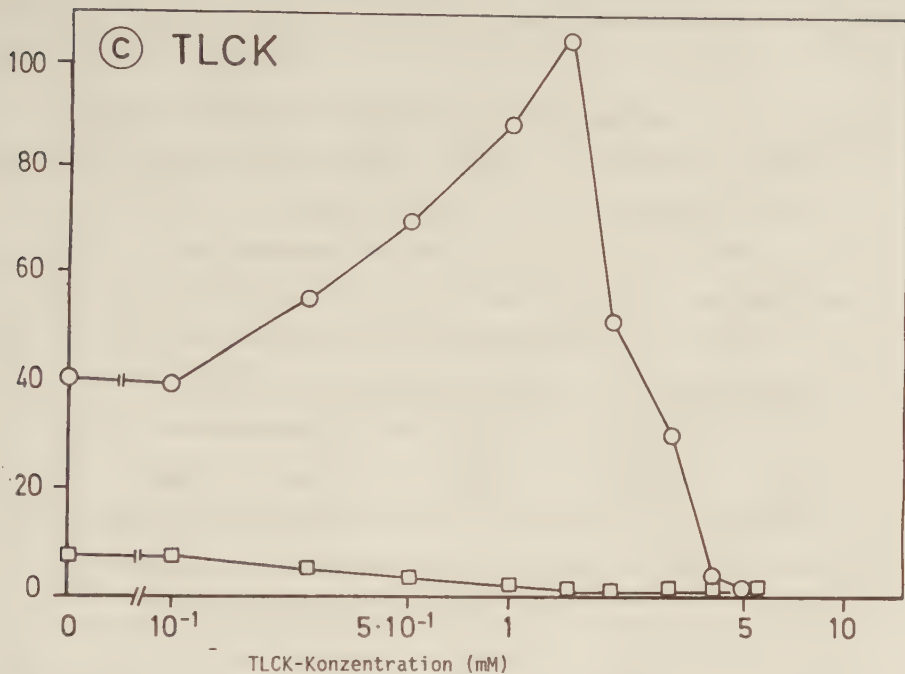


Abb. 5c+d: Einfluß der Proteasehemmer TLCK und SBTI auf die Stimulierung von Maus-Milz-Zellen

Der Serinproteasehemmer DFP war in (End-) Konzentrationen von 0,1-10 mM in den Zellkulturen enthalten (Abb. 5a). In niedrigen Konzentrationen bewirkte DFP einen leichten Rückgang der ^3H -Thymidineinbaurate der ConA-haltigen Kulturen. Ein weiteres Anheben der DFP-Konzentration führte jedoch zu einer Steigerung der ^3H -Thymidineinbaurate auf das zwei- bis vierfache der ConA-Kontrollkulturen (in der Abb. als 0 mM DFP). In den meisten Experimenten wurde eine maximale Steigerung der Thymidinaufnahme bei 2 mM DFP beobachtet. Höhere Konzentrationen als die maximal steigernde führten zu einer kontinuierlichen Reduktion des ConA-induzierten Thymidineinbaus bis deutlich unter das ConA-Niveau, also zu einer Hemmung der ConA-Stimulation. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen führte DFP in Kulturen ohne ConA nur zu einer dosisabhängigen, kontinuierlichen Hemmung der Thymidinaufnahme der MMZ.

PHENYLMETHYLSULFONYLFLUORID (PMSF): PMSF, ebenfalls ein Serinproteasehemmer, der seine Wirkung durch Alkylierung von Serin entfaltet (43), zeigte eine ähnliche Dosis-Wirkungskurve wie DFP. Konzentrationen zwischen 0,5 mM und 1,5 mM führten zu einer maximalen Steigerung des ConA induzierten Thymidineinbaus (Abb. 5b). Höhere Konzentrationen dagegen führten wie im Falle von DFP zu einer Reduktion der Thymidinaufnahme bis unter das ConA-Niveau. In Kulturen, die kein ConA enthielten, konnte kein Anstieg der Thymidinaufnahme beobachtet werden. PMSF reduzierte dosisabhängig den Thymidineinbau in die Milzzellen.

N- α -TOSYL-L-LYSYL-L-CHLORO-METHYLKETON (TLCK): Auch TLCK, ein synthetischer PH, der auf Trypsin, Plasmin, Thrombin und Sulfhydrylproteasen (wie z.B. Papain) wirkt (43), zeigte eine Steigerung der ConA-Stimulation von MMZ. TLCK führte zu einer maximalen Steigerung des ConA-induzierten Thymidineinbaus in einem Konzentrationsbereich zwischen 1 mM und 2,5 mM TLCK (Abb. 5c). Höhere Konzentrationen führten zu einem steilen Abfall der ^3H -Thymidineinbaurate bis zu einer Hemmung der ConA-Antwort bei 5 mM. TLCK hatte wie DFP und PMSF einen deutlich hemmenden Einfluß auf die Thymidinaufnahme unstimulierter MMZ.

SOJABOHNEN-TRYPSININHIBITOR (SBTI): SBTI ist ein natürlich vorkommender Proteasehemmer, der selektiv Trypsin und verwandte Enzyme durch Komplexbildung hemmt (43). Ein weiterer Aspekt, der von MOREAU et al. aufgezeigt wurde (44), ist, daß SBTI seine Proteasehemmaktivität auf stimulierte Zellen nur über eine Wechselwirkung mit der Plasmamembran ausübt, im Gegensatz zu den oben genannten Proteasehemmern, die in die Zelle einzudringen vermögen. Wie Abb. 5d zeigt, steigerte SBTI ebenfalls die ConA-induzierte Thymidinaufnahme in MMZ. Ein maximaler ^3H -Thymidineinbau wurde mit 15 bis 35 Einheiten SBTI/ml erzielt. Bei höheren Konzentrationen fiel die Einbaurate deutlich ab.

Im Gegensatz zu DFP, PMSF und TLCK verursachte SBTI von sich aus, d.h. auch in Abwesenheit von ConA eine Stimulation der MMZ. Wir vermuten, daß diese Stimulation auf den Lektincharakter des pflanzlichen PH zurückgeführt werden kann.

α -1-ANTITRYPSIN (α -1-AT) UND TRASYLOL^R: α -1-Antitrypsin ist ein Proteasehemmer, der im menschlichen Serum enthalten ist und auf Trypsin und Chymotrypsin einwirkt.

α -1-AT zeigte unter denselben Versuchsbedingungen wie oben keinen Einfluß auf die ConA-Antwort. Es konnte bei verschiedenen Konzentrationen von α -1-AT keine Veränderung des Thymidineinbaus sicher nachgewiesen werden. Ebenfalls keinen Einfluß auf die ConA-Stimulation von MMZ zeigte der PH Trasylol.

Dafür könnten folgende Gründe diskutiert werden:

1. biologische Unwirksamkeit in unserem System
2. Inaktivität der getesteten Chargen
3. Verfehlung der optimalen Konzentration

Alle getesteten Inhibitoren, ausgenommen SBTI, stimulierten nur in ConA-haltigen Kulturen, d.h. daß eine Basisstimulation durch das Mitogen für die Wirkung der Inhibitoren notwendig war.

3.2.2. Vergleich der Wirksamkeit von SBTI, PMSF, DFP und TLCK

Mit dem folgenden Experiment sollte versucht werden, mit Hilfe der unterschiedlichen Wirkungsspektren der getesteten PH auf jene Proteasen zu schließen, deren Inhibition zu einer Steigerung der Lymphozytenstimulation führte. Deshalb untersuchten wir den Einfluß der Inhibitoren im gleichen Experiment auf die gleiche Zellpopulation, um deren maximale Effekte vergleichen zu können. 3×10^6 MMZ/ml wurden zusammen mit 7,5 μ g ConA/ml und verschiedenen PH-Konzentrationen für 48 Stunden kultiviert. Vier Stunden vor der Ernte erhielten die Zellkulturen 0,5 μ Ci

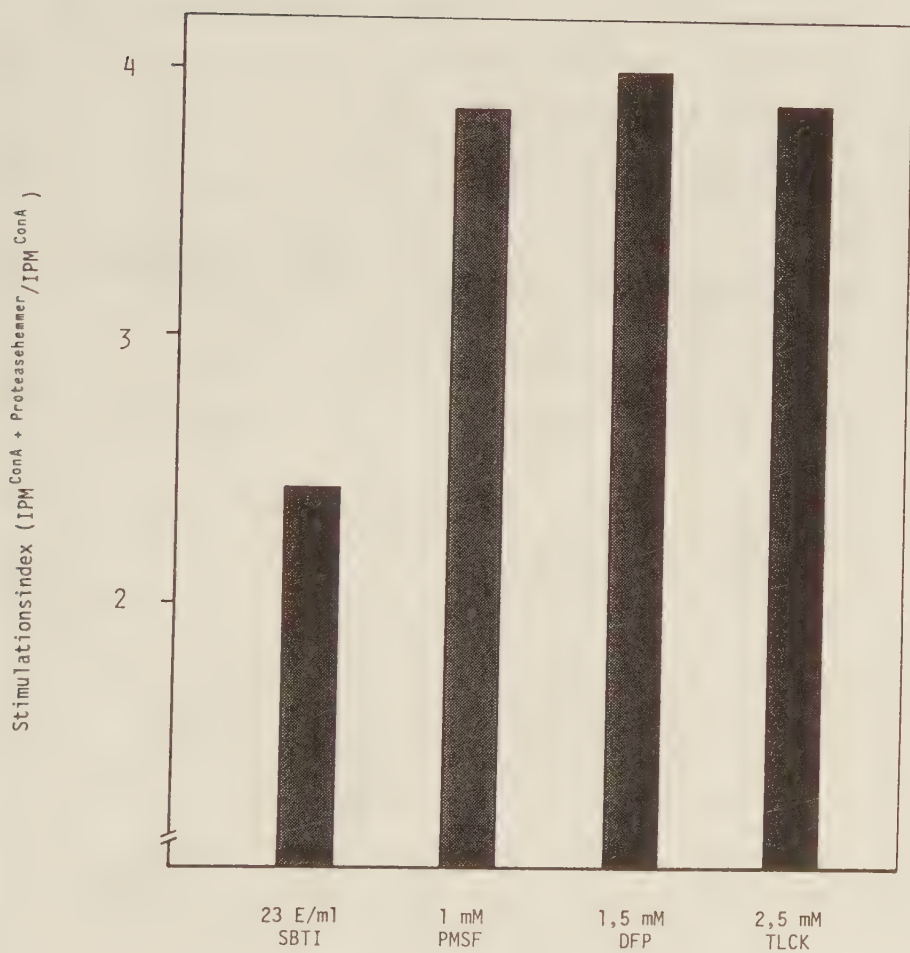


Abb. 6: Vergleich der Wirksamkeit von SBTI, PMSF, DFP und TLCK

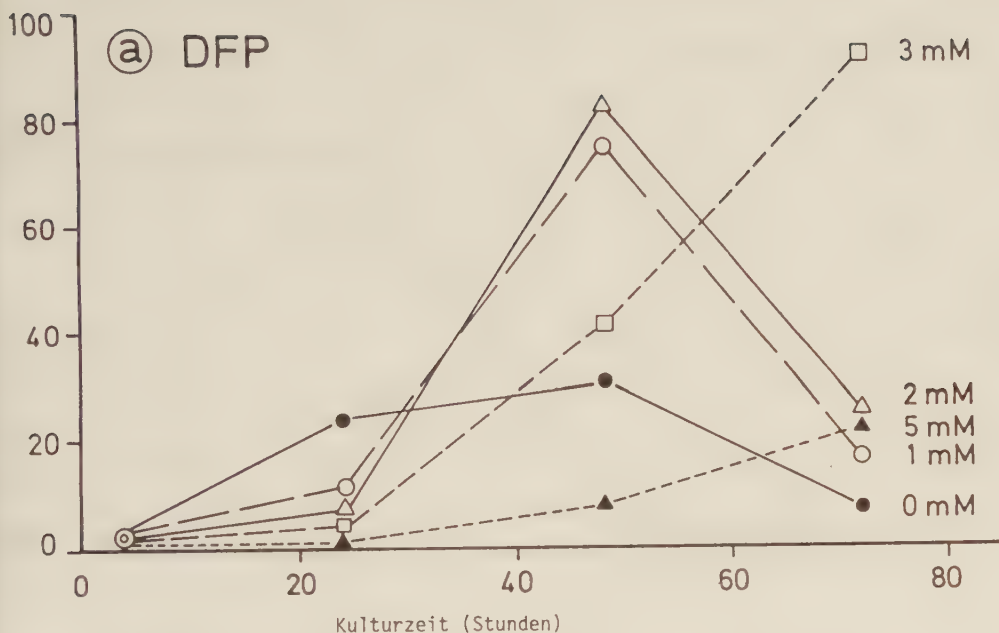
^3H -markiertes Thymidin. Der Stimulationsindex wurde aus dem Verhältnis der ^3H -Thymidin-Einbauraten ConA plus PH-haltiger Kulturen zu den ConA-Kontroll-Kulturen berechnet. Die Abbildung zeigt ein für insgesamt drei Experimente repräsentatives Ergebnis. Die Abweichungen der mittleren ^3H -Thymidineinbauraten lagen unter 6 %. In der Abb. 6 sind die Stimulationsindices für die jeweils optimal stimulierende Konzentration (von mehreren getesteten) der vier stimulierenden PH aufgetragen. Die Versuche zeigten, daß optimale Konzentrationen von SBTI einen deutlich geringeren Effekt auf die ConA-Antwort hatten als optimale Konzentrationen der übrigen Inhibitoren. Zwischen PMSF, DFP und TLCK war jedoch kein klarer Unterschied feststellbar.

3.2.3. Messung des ^3H -Thymidineinbaus in ConA-stimulierte MMZ unter Einfluß von Proteasehemmern nach vier, 24, 48 und 72 Stunden

Die folgenden Experimente zielten darauf ab, die Einflüsse der verschiedenen Proteasehemmer auf die ConA-Antwort in ihrem zeitlichen Verlauf zu beschreiben. Zu diesem Zweck wurden drei bis fünf PH-Konzentrationen, die normalerweise die höchsten Steigerungen der ConA-Antwort (Ernte nach 48 Stunden) hervorriefen, den Kulturen (die jeweils $7,5\text{ }\mu\text{g}$ ConA/ml und 3×10^6 MMZ/ml enthielten) zu Beginn der Kultivierung zugesetzt. Nach vier, 24, 48 und 72stündiger Kulturzeit wurden die Kulturen geerntet und der Einbau des ^3H -markierten Thymidins, das jeweils

IPM x 10⁻³ / Kulturzeit (Stunden)

(a) DFP



(b) PMSF

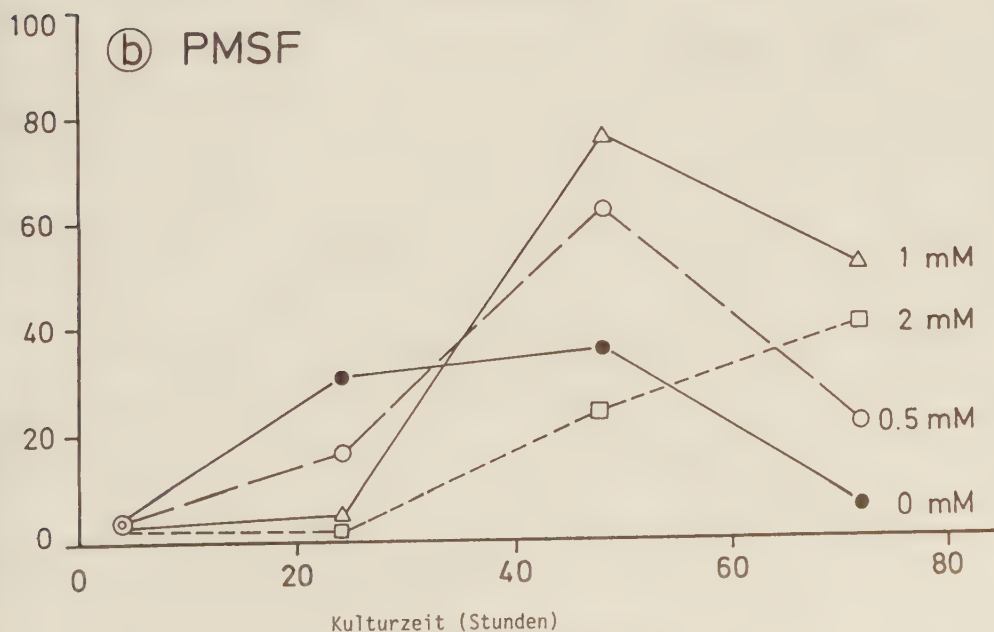


Abb. 7a+b: Kinetik: Messung des ³H-Thymidineinbaus in ConA-stimulierte MMZ unter dem Einfluß verschiedener Konzentrationen von Proteasehemmern nach verschiedenen Kulturzeiten

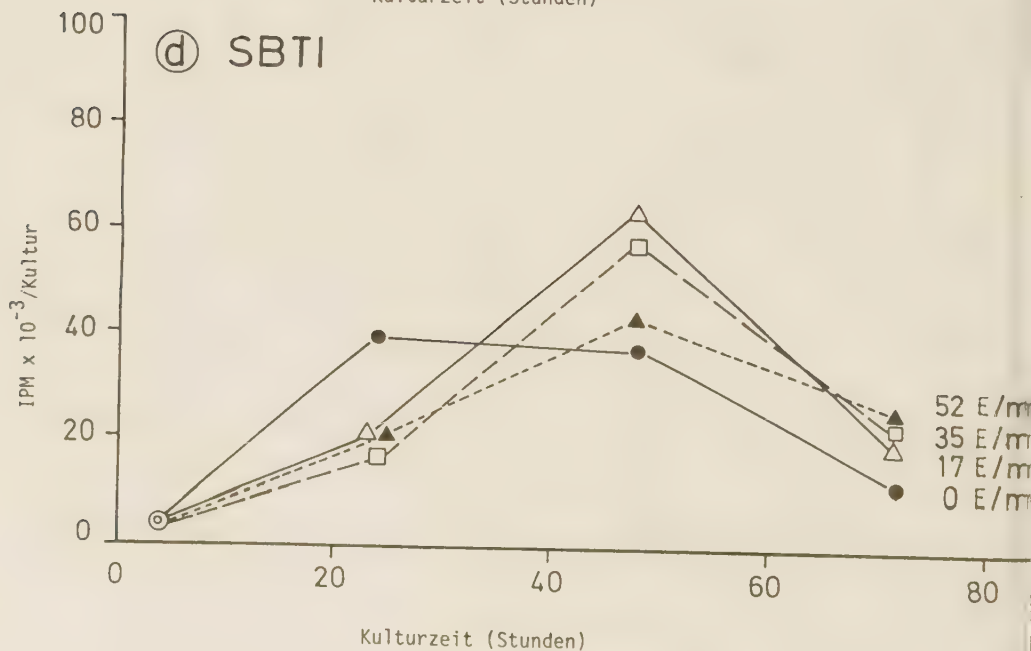
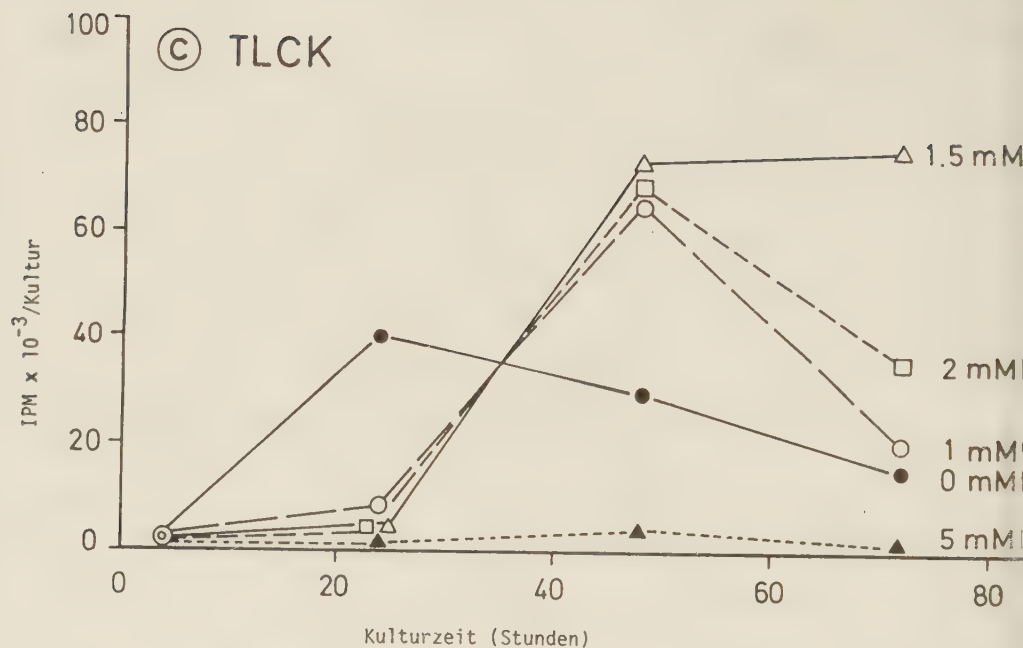


Abb. 7c+d: Kinetik: Messung des ^3H -Thymidineinbaus in ConA-stimulierte MMZ unter dem Einfluß verschiedener Konzentrationen von Proteasehemmern nach verschiedenen Kulturzeiten

vier Stunden vor Ablauf der Kulturzeit zugesetzt worden war, in die MMZ gemessen.

Die Ergebnisse zeigen die Abb. 7a-d. *Nach vierstündiger Kulturzeit* konnte kein Effekt der PH auf den Thymidineinbau der MMZ nachgewiesen werden. Messungen *nach 24-stündiger Kulturzeit* ergaben in ConA + PH-haltigen Kulturen eine deutliche Verminderung der ^3H -Thymidinaufnahme der MMZ im Vergleich zu den ConA-Kontrollen (kein PH enthalten, statt dessen MEM zugesetzt). Im Falle von DFP und PMSF war diese Inhibition nach 24-stündiger Inkubation umso deutlicher ausgeprägt, je höher die zugesetzten Konzentrationen gewesen waren. Bei TLCK und SBTI konnten wir diese Beobachtung nicht machen.

Nach 48-stündiger Kulturzeit zeigten die in den geeigneten Konzentrationen zugesetzten PH eine deutliche Steigerung des ConA-induzierten Thymidineinbaus der MMZ.

Etwas höhere Konzentrationen als die zum Zeitpunkt 48 Stunden optimal steigernden PH-Konzentrationen wie z.B. 3 mM DFP oder 2 mM PMSF, führten zu einer leichten Steigerung oder zu einer leichten Hemmung der ConA-Antwort nach 48 Stunden, zeigten jedoch eine deutlich ausgeprägte Steigerung des ConA-induzierten Thymidineinbaus nach 72 Stunden. Alle PH-Konzentrationen, die die ConA-Antwort nach 48-stündiger Kulturzeit steigerten, führten auch zu einer Steigerung nach 72 Stunden. Dabei fiel jedoch auf, daß für maximale Effekte nach 72 Stunden höhere PH-Konzentrationen als für maximalen Thymidineinbau nach 48 Stunden nötig waren.

3.2.4. Einfluß der Proteasehemmer auf die ConA-Stimulation von MMZ bei Zugabe nach verschiedenen Kulturzeiten

Die verstärkte DNA-Synthese ist ein Prozeß, der im Verlauf der Lymphozytenstimulation erst relativ spät auftritt. Frühe Veränderungen sind dagegen Änderungen in der Beschaffenheit der Zellmembran wie z.B. erhöhter Ionen- und Aminosäuretransport, Aktivierung des Phospholipidmetabolismus, Glykoproteinsynthese, Aktivitätsänderungen von Enzymen, die bei der cAMP-Produktion eine Rolle spielen und ein ATP-Verbrauch (45).

Uns interessierte deshalb, an welcher Stelle innerhalb des Zellzyklus die PH ihre Wirkung ausüben, d.h. ob sie schon zu Beginn des Aktivierungsprozesses in der Kultur anwesend sein müssen oder erst später. Um diese Frage zu beantworten, wurden die PH den Milzzellkulturen zu verschiedenen Kulturzeiten zugesetzt: und zwar zum Zeitpunkt 0, 15, 24 und 39 Stunden. Da die Kulturen nach 48 Stunden geerntet wurden, ergab sich daraus eine Anwesenheit der PH in der Kultur von 48, 33, 24 und neun Stunden. Die Abb. 8a+b zeigt den Thymidineinbau der MMZ in Abhängigkeit von der Anwesenheit der PH in der Kultur. Dabei bedeutet "0-stündige Anwesenheit" die Kennzeichnung der ConA-Kontrolle ($\emptyset$ PH), und z.B. neun-stündige Anwesenheit, daß der PH nach 39-stündiger Kultivierung zugesetzt wurde und dann bis zum Ablauf der Kulturzeit nach 48 Stunden in der Kultur verblieb. Zugemischt wurden die PH in den Mengen, welche normalerweise die größte Steigerung der ConA-Antwort hervorriefen, nämlich 2 mM DFP und 23 IE SBTI.

Dieses Experiment zeigte, daß DFP die ConA-Antwort inhibierte, wenn es erst nach 39-stündiger Kultivierung zugesetzt wurde, d.h. nur neun Stunden in der Kultur anwesend war (Abb. 8a). DFP inhibierte auch dann den ConA induzierten Thymidineinbau, wenn es nur in den letzten 24 Stunden in der Kultur anwesend war. Eine 33-stündige Anwesenheit von DFP führte dann zu einem Anstieg der Thymidineinbaurates. Maximale Thymidinaufnahme war nach 48-stündiger Anwesenheit zu finden, d.h., wenn DFP vom Beginn der Kultivierung an in der Kultur anwesend war. Im Falle von SBTI zeigte sich ein ähnliches Ergebnis (Abb. 8b). SBTI führte jedoch schon zu einer Hemmung des ^3H -Thymidineinbaus in die ConA-stimulierten MMZ, wenn es nach 15 Stunden zugegeben wurde, d.h. über 33 Stunden bis zur Ernte in der Kultur anwesend war. Eine Steigerung der ConA-Antwort konnte nur nachgewiesen werden, wenn SBTI von Anfang an in der Kultur enthalten war. Somit hatten wir gefunden, daß die PH umso ausgeprägter die ConA-Antwort steigerten, je früher sie den MMZ-Kulturen zugesetzt wurden. Wir wollten aber noch durch ein weiteres Experiment herausfinden, ob im Falle der Inhibition bei späterer Zugabe der *Zeitpunkt der Zugabe* entscheidend war, oder ob hier die *Dauer der Einwirkung* von PH für deren stimulierende Wirkung zu kurz gewesen ist. Deshalb wurden die PH zu denselben Kulturzeiten, d.h. zum Zeitpunkt null, 15 und 24 Stunden zugesetzt; die Kulturen jedoch erst nach weiterer Kultivierung von jeweils 48 Stunden geerntet, d.h. nach 48, 63 und 72 Stunden.

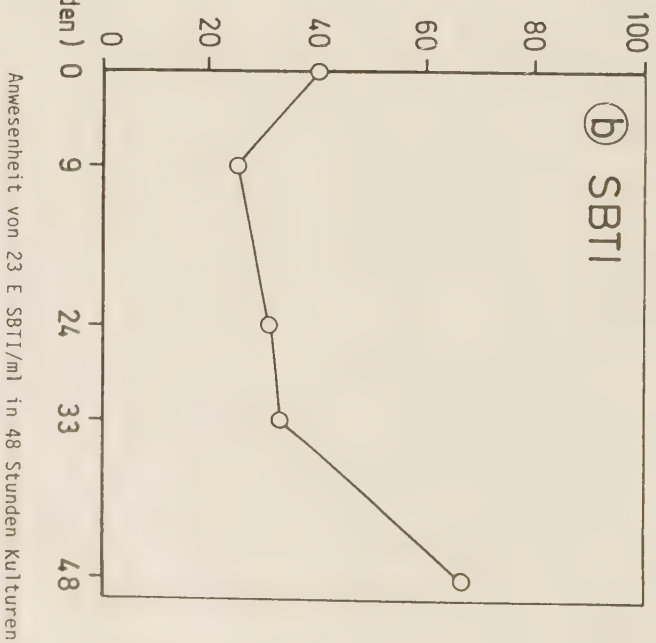
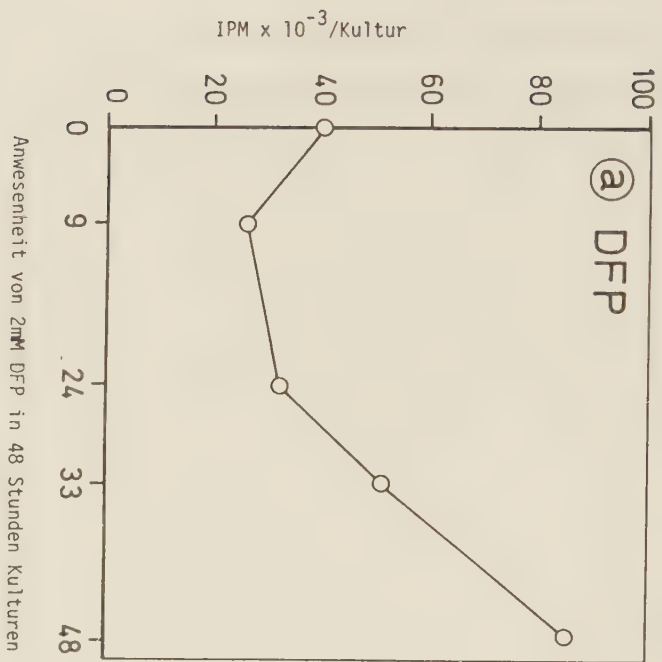
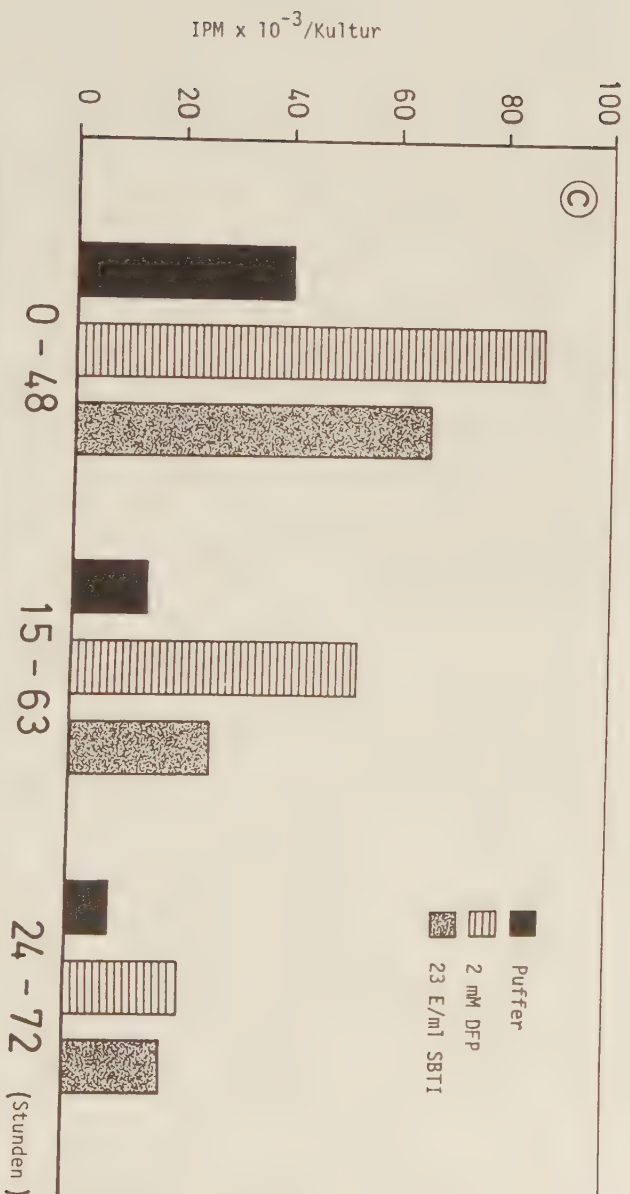


Abb. 8a+b: Einfluß der Proteasehemmer DFP und SBTI auf die ConA-Stimulierung von Maus-Milz-Zellen bei Zugabe nach verschiedenen Kulturzeiten



48-stündige Anwesenheit der Proteasehemmer in 48, 63 und 72 Stunden-Kulturen bei Zugabe der Proteasehemmer 0, 15 und 24 Stunden nach Beginn der Kultivierung

Abb. 8c: Einfluß der Proteasehemmer DFP und SBTI auf die ConA-Stimulierung von Maus-Milz-Zellen bei Zugabe nach verschiedenen Kulturzeiten

Dabei konnten wir *auch bei späterer Zugabe* der Inhibitoren DFP und SBTI eine deutliche Steigerung der ConA-Antwort feststellen (Abb. 8c). So inhibierte 2 mM DFP, *das nach 24 Stunden zugegeben wurde*, die ConA-Antwort bei 24-stündiger Anwesenheit, steigerte sie jedoch nach 48-stündiger Anwesenheit in der Kultur. 23 Einheiten SBTI/ml, *nach 15 Stunden zugegeben*, zeigten eine leichte Hemmung des ConA induzierten Thymidineinbaus bei 33-stündiger, eine deutliche Steigerung der Thymidinaufnahme bei 48-stündiger Anwesenheit in der Kultur.

Während im Laufe der Kultivierung die absolute Thymidineinbaurrate sowohl in den ConA-, als auch den ConA + DFP und ConA + SBTI - Kulturen zurückging, war der Stimulationsindex nach 63- und 72-stündiger Kultivierungsdauer größer als nach 48 Stunden. Den höchsten Stimulationsindex wiesen ConA + DFP - Kulturen auf, die nach 63 Stunden geerntet worden waren, gefolgt von den Kulturen, die nach 72 und nach 48 Stunden geerntet worden waren.

- Zusammengefaßt:
1. Die PH müssen nicht von Beginn der Kultivierung an in der Kultur enthalten sein.
 2. Die PH benötigen eine Einwirkungs-
dauer von ca. 48 Stunden.

Hinzugefügt werden soll, daß die Steigerung der ConA-Antwort nie während der ersten 24 Stunden der Kulturzeit beobachtet wurde.

3.2.5. Beobachtung der Vitalität von ConA-stimulierten MMZ bei verschiedenen PH-Konzentrationen im Vergleich zum ^3H -Thymidineinbau

Um den Einfluß der PH auf die Lebensfähigkeit der MMZ festzustellen, wurden die Zellen in der Anwesenheit von ConA und verschiedenen Konzentrationen der PH DFP und SBTI für 48 Stunden kultiviert. Danach wurde die Vitalität der stimulierten MMZ mit Hilfe der Trypanblaufärbung ermittelt. Abb. 9 zeigt die Prozentsätze vitaler Zellen bei verschiedenen PH-Konzentrationen im Vergleich zum ^3H -Thymidineinbau. In der Abbildung sind jeweils die Resultate von vier Experimenten im Mittelwert zusammengefaßt. Der Anteil lebender Zellen war leicht erhöht in ConA-Kulturen, die 2 mM DFP enthielten, d.h. die DFP-Menge, die normalerweise die höchste ^3H -Thymidineinbaurate hervorrief. Bei höheren Konzentrationen wie 3, 4 oder 5 mM DFP, d.h. Konzentrationen, bei denen der Thymidineinbau inhibiert war, erniedrigte sich der Prozentsatz lebender Zellen (Abb. 9a). SBTI zeigte ein ähnliches Verhalten. SBTI verursachte einen leichten Anstieg des Anteils vitaler Zellen in ConA-Kulturen, die 17 Einheiten SBTI/ml enthielten, also bei der SBTI Konzentration, die normalerweise die höchste ^3H -Thymidineinbaurate hervorrief (Abb. 9b). In höheren Konzentrationen (35 und 52 Einheiten SBTI) inhibierte SBTI die Thymidinaufnahme und reduzierte den Anteil lebender Zellen.

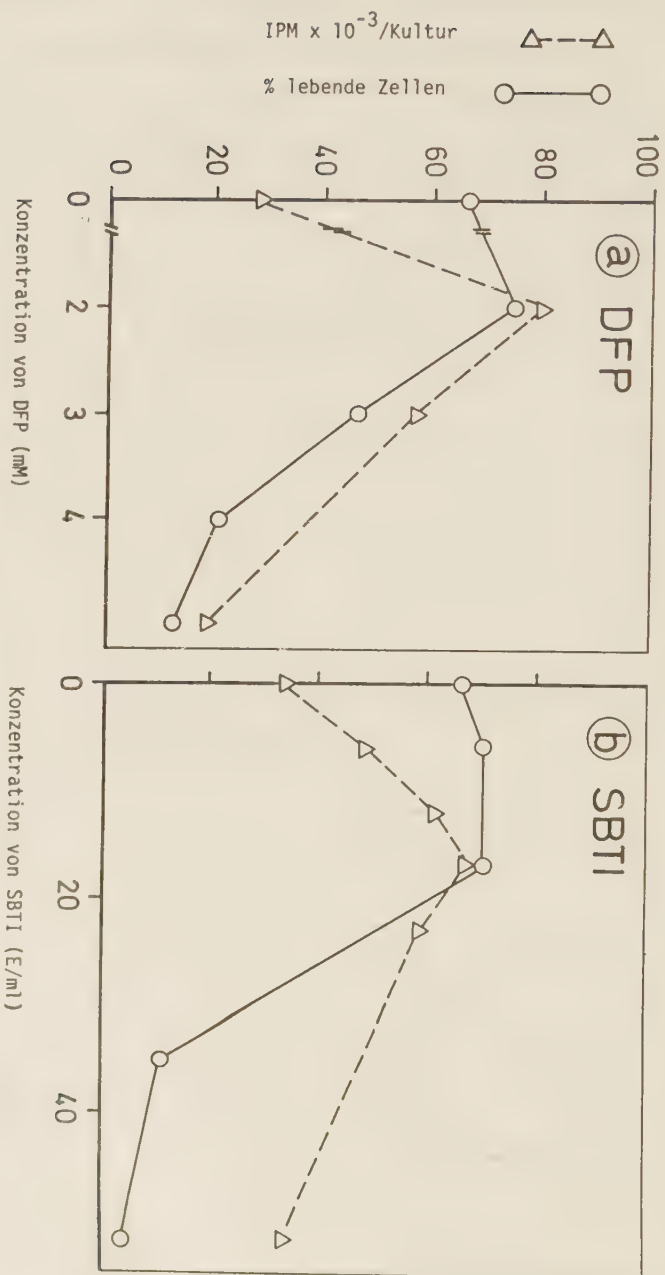


Abb. 9: Prozentsatz lebender Zellen im Vergleich zum ³H-Thymidineinbau

3.2.6. Beobachtung des Aggregationsverhaltens von ConA stimulierten MMZ bei verschiedenen PH-Konzentrationen im Vergleich zum ^3H -Thymidineinbau

Obwohl Lymphozytenstimulation und Aggregation nicht in jedem Fall assoziiert sind, so spielt doch in vielen Fällen die Aggregation, immer jedoch ein Zell-Zell-Kontakt innerhalb der Aktivierung von Lymphozyten eine große Rolle (46). Im folgenden sollte der Einfluß der stimulationssteigernden PH auf das Phänomen der durch das Mitogen ConA verursachten Lymphozytenaggregation untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden die Milzzellen in der Anwesenheit von ConA (7,5 µg/ml Kulturflüssigkeit) und DFP und SBTI in verschiedenen Konzentrationen für 48 Stunden kultiviert. Nach Ablauf der Kulturzeit wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert. In der Neubauer-Zählkammer wurden die einzelnen, nicht aggregierten Zellen ausgezählt und daraus der Prozentsatz an aggregierten Zellen berechnet.

Abb. 10 zeigt die Prozentsätze aggregierter Zellen bei verschiedenen PH-Konzentrationen im Vergleich zum ^3H -Thymidineinbau. In der Abbildung ist jeweils der Mittelwert der Resultate von vier Experimenten eingetragen. Der Prozentsatz aggregierter Zellen stieg von 46 % in ConA-Kulturen (ohne PH) auf 54 % in Kulturen, die 2 mM DFP enthielten (Abb. 10a), bzw. auf 68 % in Kulturen, die 17 Einheiten SBTI/ml enthielten (Abb. 10b). Wir beobachteten also eine leichte Steigerung der Aggregation bei den PH Konzentrationen, die normalerweise die höchsten ^3H -Thymidineinbauraten hervorriefen. Im Falle von DFP stieg der

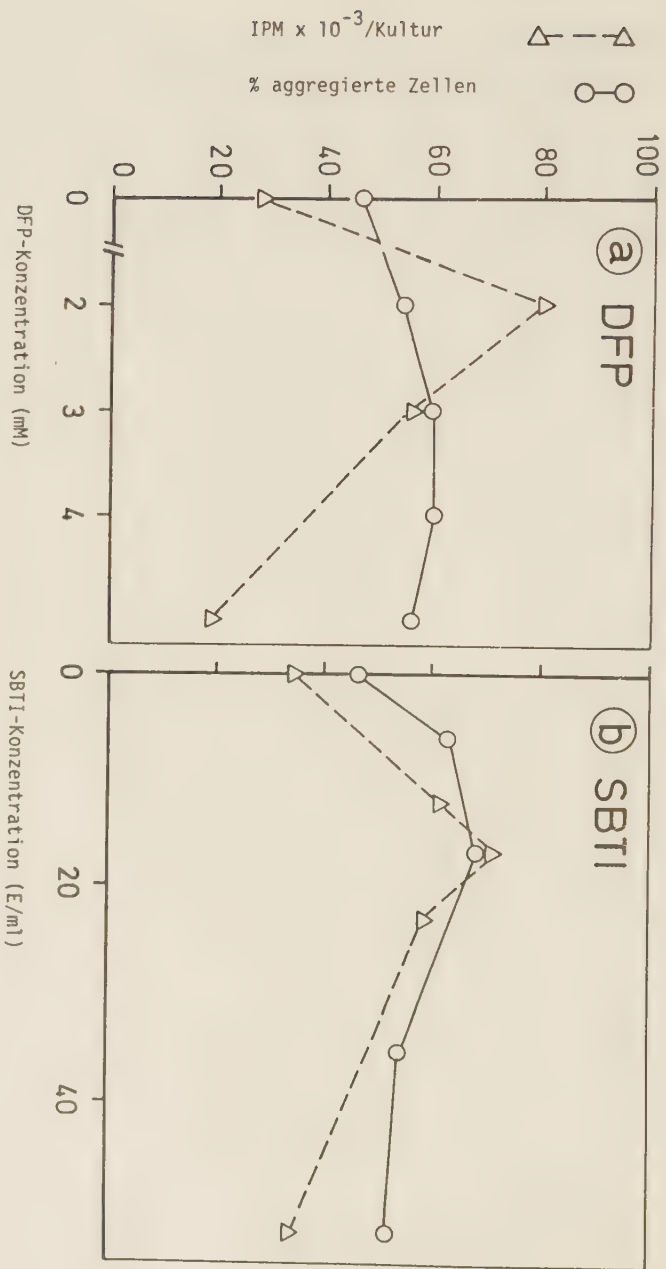


Abb. 10: Prozentsatz aggregierter Zellen im Vergleich zum ³H-Thymidineinbau

Prozentsatz aggregierter Zellen weiter an bis auf 60 % bei 3 mM und 4 mM DFP, um danach wieder abzufallen. Die Aggregate, die von 2 mM DFP und 17 Einheiten SBTI/ml hervorgerufen worden waren, bestanden dabei aus einer maximalen Anzahl vitaler Zellen, während die bei höheren PH-Konzentrationen gefundenen Aggregate aus zunehmend toten Zellen bestanden (siehe Abb. 9).

3.2.7. Einfluß von DFP auf den ConA-induzierten ^3H -Thymidineinbau von Lymphozyten des Thymus und des peripheren Blutes im Vergleich zu MMZ

Im folgenden Experiment sollte versucht werden, den Einfluß von DFP auf die Lymphozytenstimulation auch in anderen Geweben der Maus näher zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden gleiche Konzentrationen von Maus Milz-Zellen (MMZ), Maus-Thymozyten (MTHY) und Maus-Periphere-Blut-Lymphozyten (MPBL) (jeweils 3×10^6 Zellen/ml Kulturflüssigkeit) zusammen mit ConA (7,5 $\mu\text{g/ml}$ Kulturflüssigkeit) und ConA *plus* 1; 1,5; 2; 2,5 und 3 mM DFP für 48 Stunden unter den vorher beschriebenen Bedingungen kultiviert. Vier Stunden vor Ablauf der Kulturzeit erhielten die Zellkulturen 0,5 μCi ^3H -markiertes Thymidin. Die Resultate zeigt Abb. 11. Die Abbildung gibt die Ergebnisse eines Experimentes wieder, das charakteristisch für drei durchgeführte Experimente ist. Die Abweichung von der mittleren ^3H -Thymidineinbaurrate war dabei geringer als 7,5%.

Der ConA-induzierte ^3H -Thymidineinbau der MMZ konnte dabei wie oben beschrieben mit den geeigneten Konzentrationen

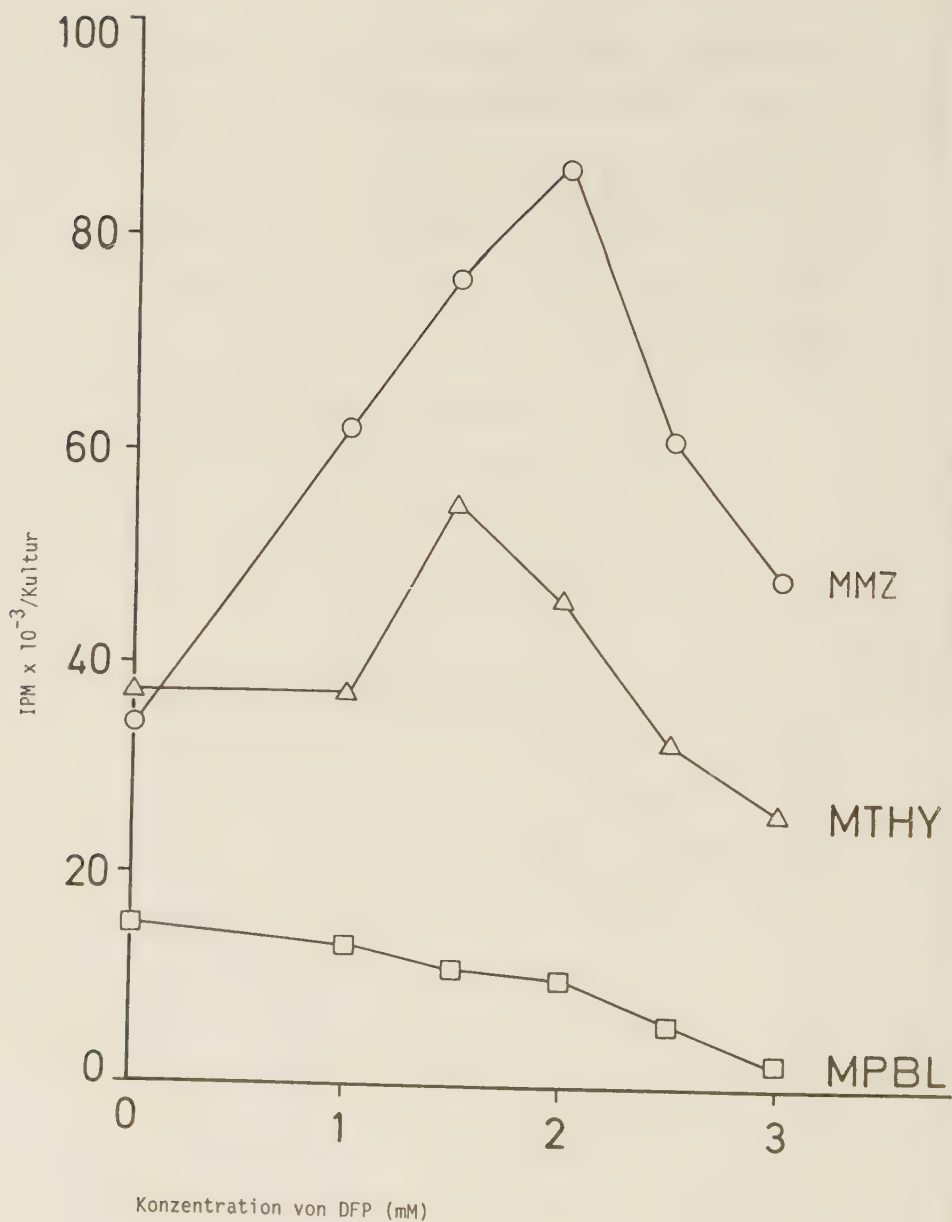


Abb. 11: Einfluß von DFP auf den ConA-induzierten ^3H -Thymidineinbau von Thymozyten (MTHY) und peripheren Blutlymphozyten (MPBL) im Vergleich zu Milzzellen (MMZ)

an DFP gesteigert werden (siehe Abb. 5a und 11). Auch bei Maus-Thymozyten konnte eine DFP-abhängige Steigerung der ConA-induzierten ^3H -Thymidinaufnahme beobachtet werden. Diese Steigerung wurde mit ungefähr den gleichen DFP-Konzentrationen erreicht wie bei den Milzzellen, das Ausmaß der Steigerung durch DFP war jedoch deutlich geringer. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen wurde die ConA-induzierte ^3H -Thymidinaufnahme peripherer Blutlymphozyten durch die Zugabe verschiedener DFP-Konzentrationen kontinuierlich inhibiert.

Dieses Experiment wurde auch mit niedrigeren Zellkonzentrationen durchgeführt, da durch Herzpunktion wesentlich weniger Zellen gewonnen werden konnten als durch Präparation einer Milz oder eines Thymus. Wurden lediglich 1×10^6 MMZ bzw. MTHY/ml kultiviert, zeigte sich der stimulationssteigernde Effekt von DFP auch bei einer niedrigeren DFP-Konzentration, gewöhnlich bei 0,75 mM DFP. Diese Beobachtung ist auch in Abb. 12 festgehalten.

3.2.8. Einfluß einer Erhöhung und Erniedrigung des Anteils an phagozytierenden und adhärierenden Zellen auf den Effekt von DFP

Innerhalb der T-Zell-Aktivierung spielen Makrophagen (Mφ) eine bedeutende Rolle. Die Anwesenheit von adhärierenden Zellen ist für eine optimale ConA-Antwort notwendig (17, 18, 47). Monozyten und Makrophagen sind durch ihre Fähigkeit zur Phagozytose und Adhärenz an verschiedene Materialien gekennzeichnet. Diese Eigenschaften können für die Isolierung dieser Zellen genutzt werden. Im folgenden

Experiment sollte versucht werden, den Einfluß adhärrierender und/oder phagozytischer Zellen auf die DFP-abhängige Steigerung der ConA-Antwort von MMZ zu untersuchen.

Die Zellen wurden zusammen mit 7,5 µg ConA/ml Kulturflüssigkeit und ConA plus DFP in den angegebenen Konzentrationen für 48 Stunden kultiviert. Vier Stunden vor Ablauf der Kulturzeit erhielten die Kulturen 0,5 µCi ^3H -markiertes Thymidin. Die MMZ-Kulturen enthielten 1×10^6 Zellen/ml Kulturflüssigkeit statt 3×10^6 Zellen/ml Kulturflüssigkeit wie in den oben beschriebenen Experimenten.

Die *phagozytierenden Zellen* wurden aus der Milzzellsuspension durch eine Carbylisenbehandlung entfernt.

Diese carbylisenbehandelten Milzzellen (1×10^6 Zellen/ml) wurden den adhärrierenden Zellen, die von 1×10^6 MPBL/ml gewonnen worden waren, zugesetzt und mit ConA bzw. ConA + DFP kultiviert. Ferner wurden auch die *adhärrierenden Zellen* aus der carbylisenbehandelten Milzzellsuspension mit Hilfe einer Sephadex G-10 Säule entfernt. Diese somit von *phagozytierenden und adhärrierenden Zellen befreiten* Milzzellen (jeweils 1×10^6 Milzzellen/ml) wurden den aus 1×10^6 MPBL/ml gewonnenen adhären Zellen zugesetzt und mit ConA bzw. ConA + DFP kultiviert.

Um *adhärrierende Milzzellen anzureichern*, wurden 3×10^6 MMZ/ml bei 37 °C für zwei Stunden in Mikrotiterplatten inkubiert. Danach wurden die nichtadhären Zellen durch zweimaliges Waschen mit MEM entfernt. Den somit angereicherten adhären Zellen (aus 3×10^6 MMZ/ml) wurden 1×10^6 MMZ/ml

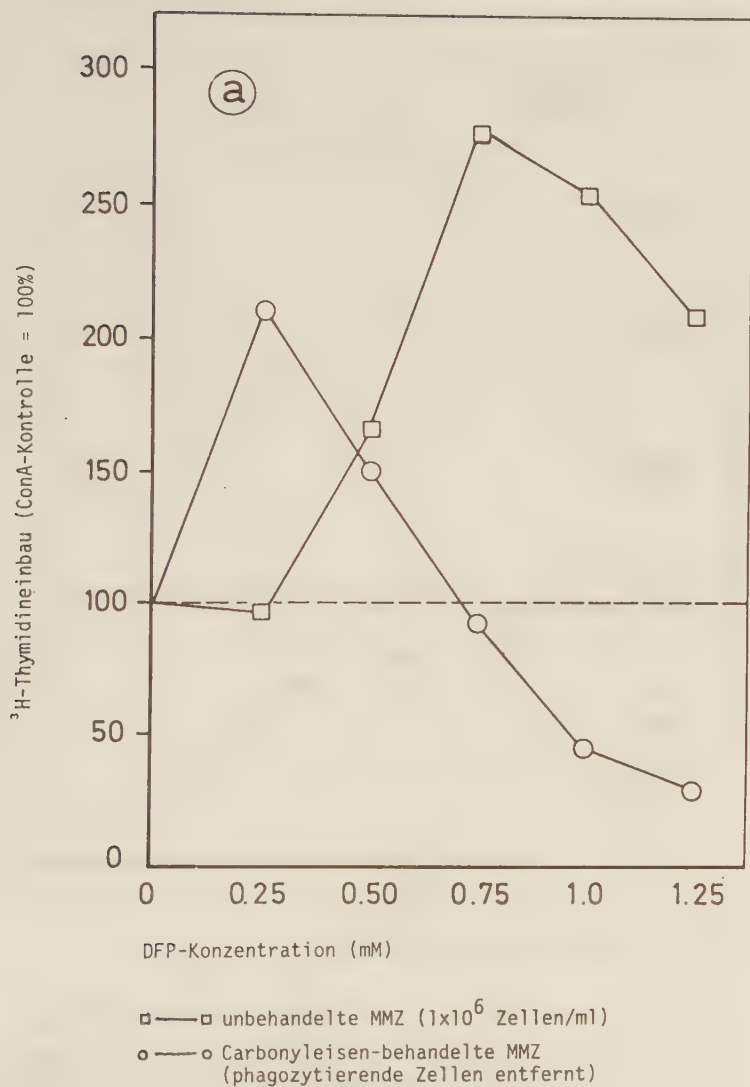


Abb. 12a: Einfluß einer Erhöhung und Erniedrigung des Anteils an phagozytierenden und adhärierenden Zellen auf den Effekt von DFP

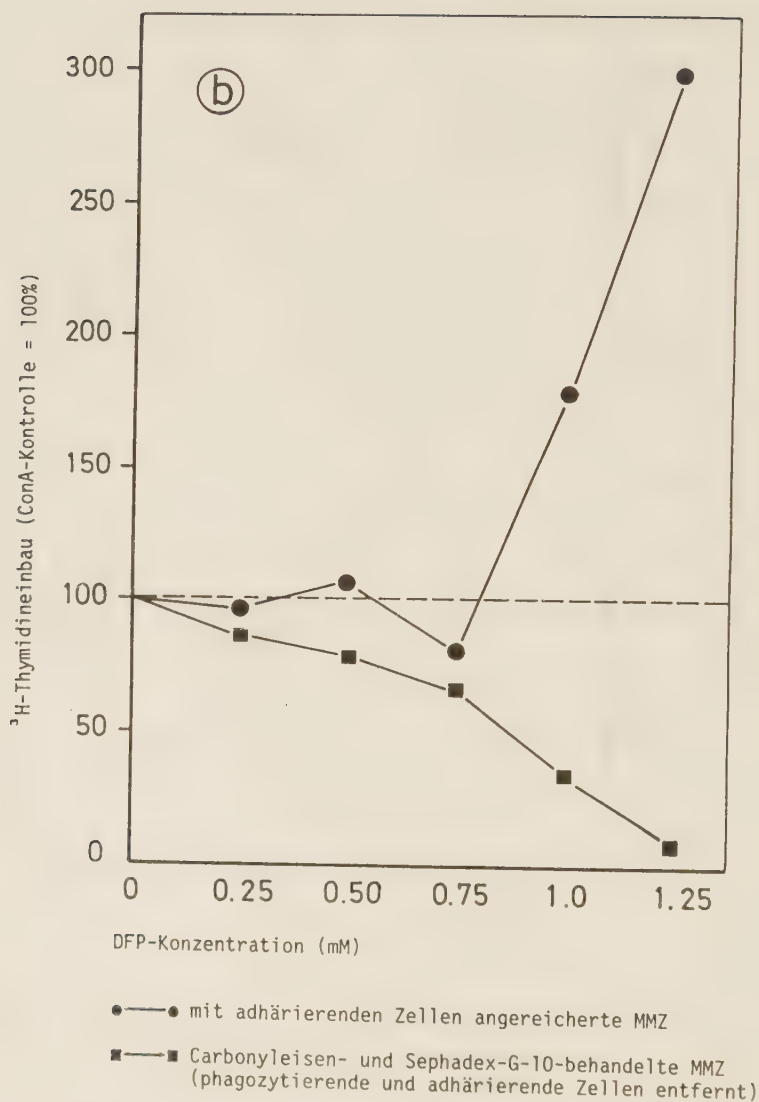


Abb. 12b: Einfluß einer Erhöhung und Erniedrigung des Anteils an phagozytierenden und adhärierenden Zellen auf den Effekt von DFP

zugesezt, die mit ConA bzw. ConA + DFP kultiviert wurden. In Abbildung 12 sind die Mittelwerte der Ergebnisse aus drei Experimenten wiedergegeben. Die Abb. 12a zeigt die Ergebnisse nach Entfernung phagozytierender Zellen im Vergleich zur unbehandelten MMZ-Suspension; die Abb. 12b die Ergebnisse nach Entfernung phagozytierender plus adhärrierender Zellen im Vergleich zu einer mit adhärrierenden Zellen angereicherten MMZ-Suspension. Man sieht, daß eine Entfernung phagozytierender Zellen aus MMZ durch Carbonyleisenbehandlung mit nachfolgender Zugabe dieser Mø-freien MMZ zu adhärennten MPBL dazu führt, daß sich die steigernde DFP-Konzentration von 0,75 mM nach 0,25 mM DFP verschiebt (Abb. 12a).

Nach einer weiteren Entfernung auch der adhärrierenden Zellen aus der MMZ-Suspension mit einer Sephadex G-10 Säule war die Steigerung der ConA-Antwort durch 0,25 mM DFP jedoch nicht mehr nachweisbar (Abb 12b). Eine Zugabe adhärrierender Zellen aus einer MMZ-Suspension zu MMZ-Kulturen führte dagegen zu einer Verschiebung der steigernden DFP-Konzentration von 0,75 mM zu höheren Konzentrationen als 1 mM DFP (Abb. 12b).

Zusammengefaßt:

1. Entfernung phagozytierender Zellen aus MMZ-Suspensionen führt zur Verschiebung der optimal stimulierenden DFP-Menge zur geringeren Konzentration.
2. Entfernung phagozytierender und adhärrierender Zellen erlaubt keine Steigerung sondern lediglich Hemmung der ConA-Antwort.

3. Anreicherung adhärierender Zellen
verschiebt die optimale DFP-Kon-
zentration zu höheren Werten.

3.3. ALKOHOLE

3.3.1. Einfluß der Alkohole 2-Propanol, 1-Propanol, Äthanol und Äthylenglykoll sowie Einfluß von Azeton auf die Stimulierung von MMZ

Da sich gezeigt hatte, daß geeignete Konzentrationen von 2-Propanol ebenso wie die oben genannten Proteasehemmer in der Lage waren, die ConA-Antwort zu steigern, sollte auch der Einfluß anderer Alkohole von niedrigem Molekulargewicht auf die Stimulierung von MMZ untersucht werden. Jeweils 3×10^6 MMZ/ml Kulturflüssigkeit wurden sowohl in Anwesenheit von ConA (7,5 µg/ml Kulturflüssigkeit) als auch ohne ConA zusammen mit verschiedenen Konzentrationen von 2-Propanol, 1-Propanol, Äthanol, Äthylenglykoll und Azeton kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in der Mikrotiterplatte bei 37 °C und 5 %iger CO₂-Atmosphäre. Vier Stunden vor Ablauf der Kulturzeit erhielten die Kulturen 0,5 µCi ³H-markiertes Thymidin. Nach 48-stündiger Kultivierung wurden die Zellen geerntet und die Aufnahme des ³H-markierten Thymidins in die DNA der MMZ als Parameter für deren Stimulierung gemessen. Die Abb. 13 zeigt den Einfluß von 2-Propanol, 1-Propanol, Äthanol, Äthylenglykoll und Azeton auf die ³H-Thymidinaufnahme von MMZ in An- und Abwesenheit von ConA.

2-PROPANOL führte in einem Konzentrationsbereich von 0,5-1 % zu einem zwei- bis vierfachen Anstieg der ^3H -Thymidineinbaurrate von ConA-haltigen Kulturen. Höhere Konzentrationen von 2-Propanol führten zu einem steilen Abfall der Thymidineinbaurrate von ConA-Kulturen bis deutlich unter das ConA-Niveau (Abb. 13a).

ÄTHANOL zeigte eine ähnliche Dosis-Wirkungskurve wie 2-Propanol. Eine maximale Steigerung der ConA-Antwort wurde mit Konzentrationen von 1-2 % Äthanol erzielt, während höhere Äthanolkonzentrationen die ConA-Antwort inhibierten (Abb. 13b).

AZETON führte zu einer maximalen Steigerung der ConA-induzierten ^3H -Thymidinaufnahme in einem Konzentrationsbereich zwischen 2 und 5 % Azeton. Höhere Azetonkonzentrationen dagegen unterdrückten die Thymidinaufnahme der MMZ nahezu vollständig (Abb 13c).

Die drei genannten Substanzen hatten dagegen keinen Einfluß auf den Thymidineinbau der MMZ in Kulturen, die kein ConA enthielten, d.h. sie zeigten ohne Einwirkung des Mitogens keine Stimulation.

Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Substanzen zeigten 1-Propanol und Äthylenglykoll keine Steigerung der ConA Antwort.

1-PROPANOL inhibierte den ConA-induzierten Thymidineinbau von MMZ deutlich in Konzentrationen, die über 0,5 % 1-Propanol lagen (Abb 13a). Dabei ging dem Abfall der

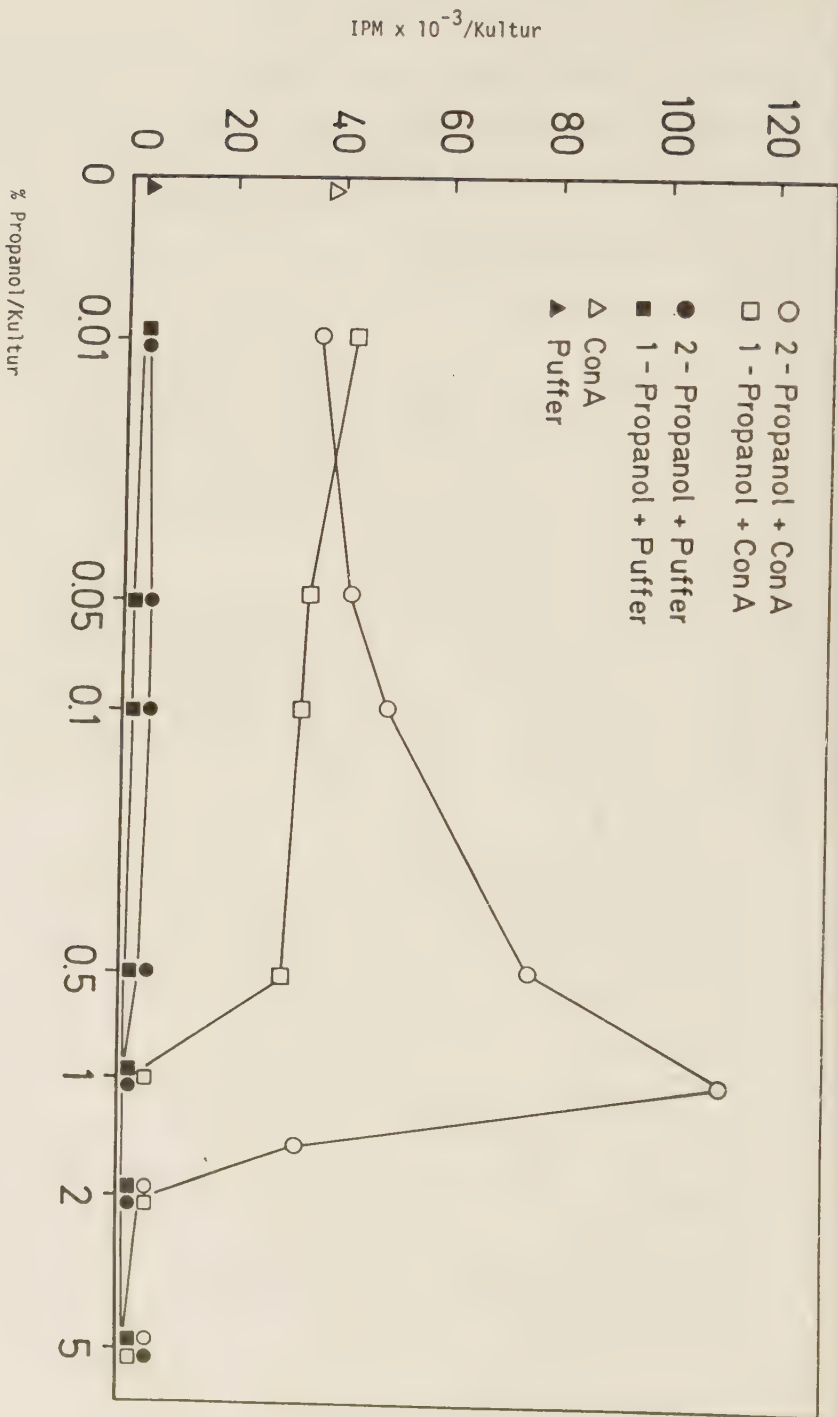


Abb. 13a: Einfluß von 2-Propanol und 1-Propanol auf den ³H-Thymidineinbau ConA-stimulierter und unstimulierter Maus-Milz-Zellen

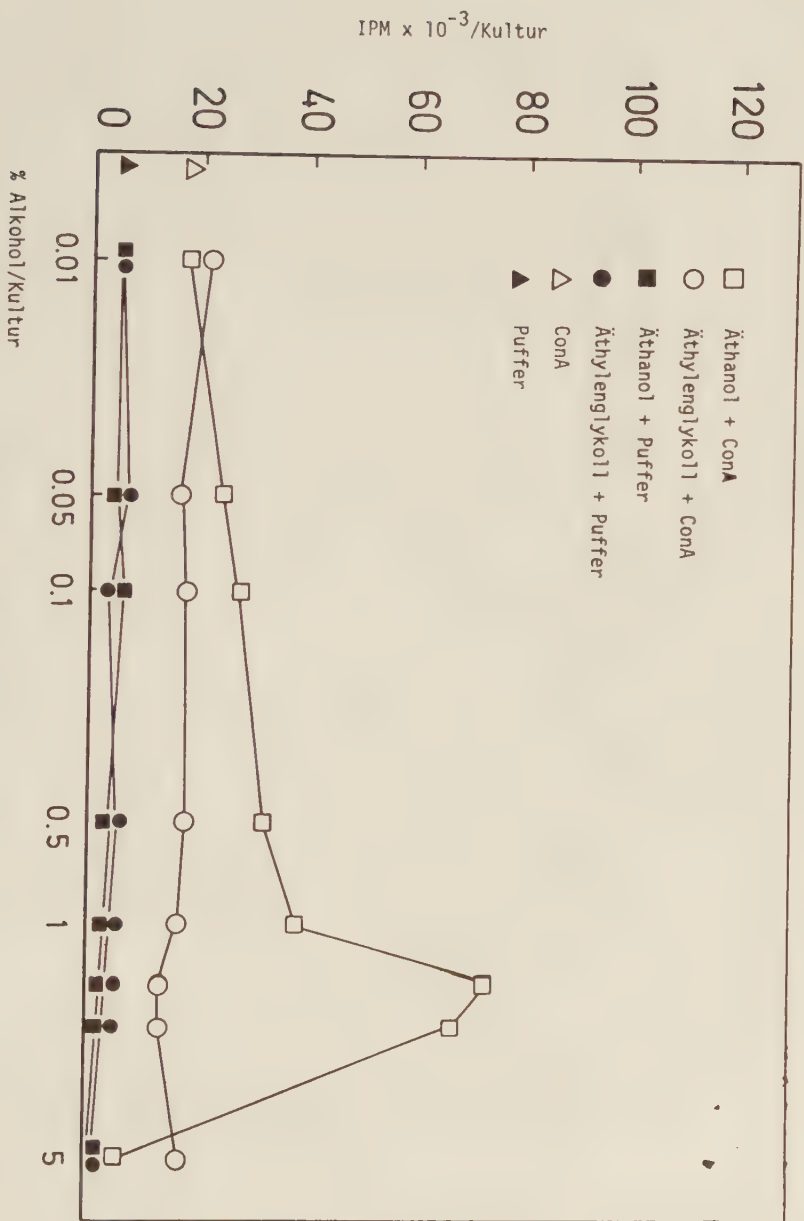


Abb. 13b: Einfluß von Äthanol und Äthylenglykoll auf den ^3H -Thymidineinbau ConA-stimulierter und unstimulierter Maus-Milz-Zellen

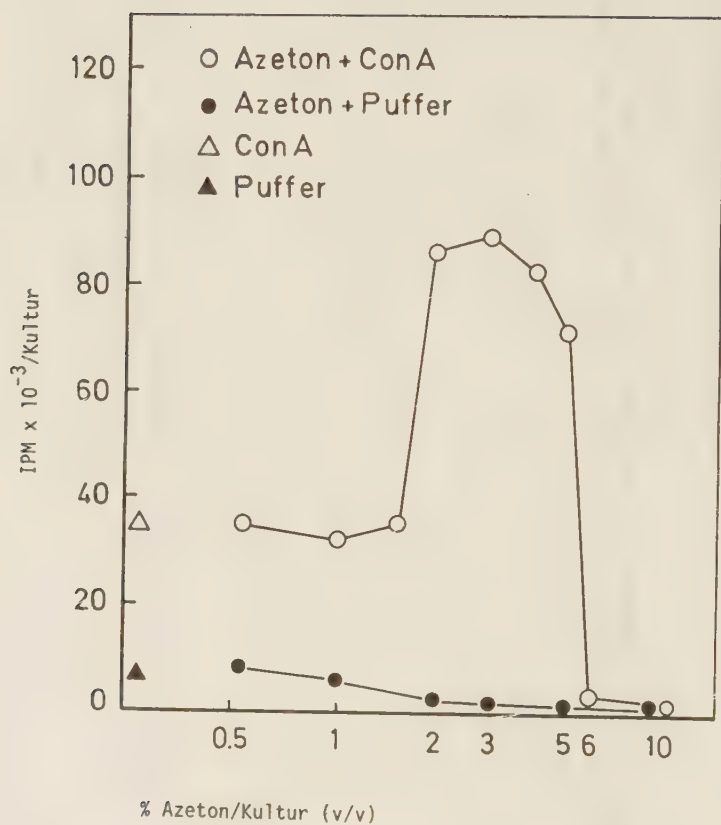


Abb. 13c: Einfluß von Azeton auf den ³H-Thymidineinbau
ConA stimulierter und unstimulierter Maus-Milz-Zellen

Thymidineinbaurates kein Anstieg voraus. Auf den Thymidineinbau in Kulturen, die kein ConA enthielten, hatte die Zugabe von 1-Propanol keinen Einfluß.

ÄTHYLENGLYKOLL hingegen zeigte in den verwendeten Konzentrationen keinerlei Einfluß auf den Thymidineinbau der MMZ, und zwar sowohl in ConA-haltigen als auch in ConA-freien Kulturen (Abb. 13b).

3.3.2. Beobachtung der Vitalität von ConA-stimulierten MMZ bei verschiedenen Alkohol-Konzentrationen im Vergleich zum ^3H -Thymidineinbau

In gleicher Weise wie bei den Proteasehemmern sollte auch im Falle der Alkohole deren Einfluß auf die Vitalität und Aggregation ConA-stimulierter MMZ untersucht werden. Um den Einfluß der Alkohole auf die Lebensfähigkeit der MMZ festzustellen, wurden 3×10^6 MMZ/ml mit $7,5 \mu\text{g}$ ConA/ml Kulturflüssigkeit und verschiedenen Konzentrationen von 2-Propanol und Äthanol für 48 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und der Anteil vitaler Zellen ausgezählt. Abbildung 14 zeigt die Prozentsätze lebender Zellen bei verschiedenen Alkoholkonzentrationen im Vergleich zum ^3H -Thymidineinbau. In die Abbildung sind jeweils die Mittelwerte der Resultate von vier Experimenten eingetragen.

Der Prozentsatz lebender Zellen war leicht erhöht in ConA-Kulturen, die 1 % 2-Propanol enthielten, d.h. die 2-Propanolmenge, die normalerweise die höchste ^3H -Thymidinaufnahme in MMZ hervorrief. In höheren

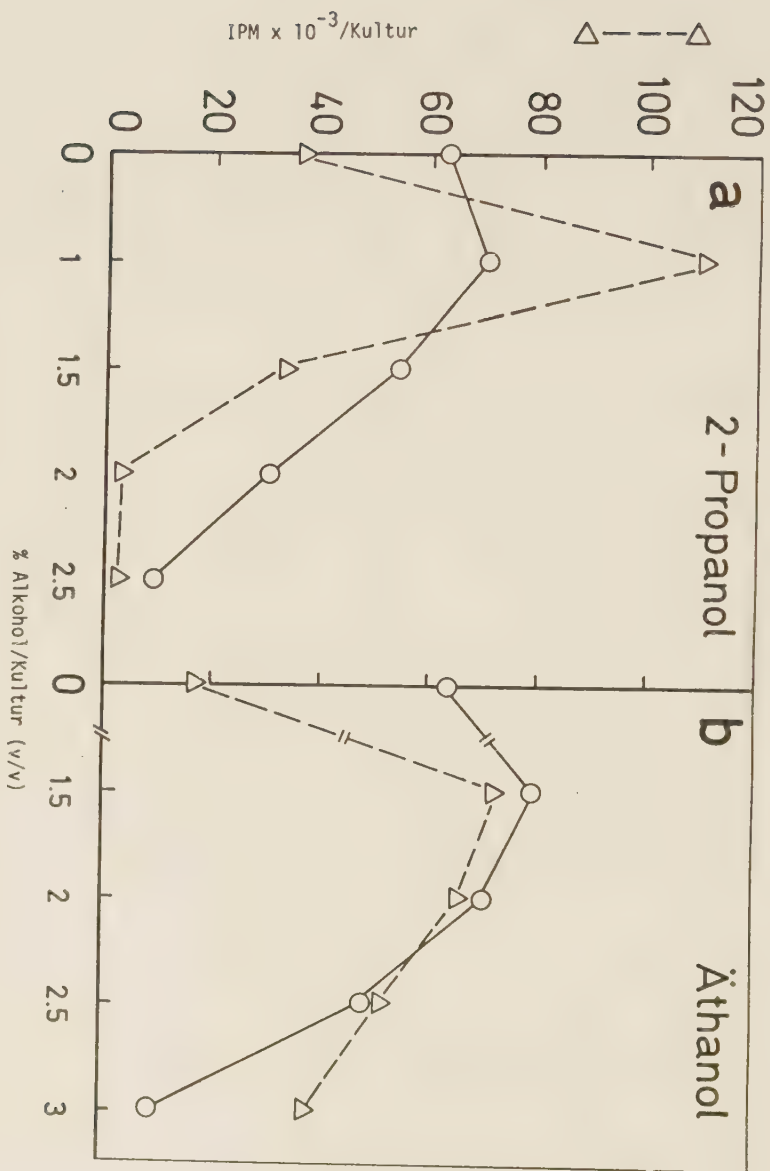


Abb. 14: Prozentsatz lebender Zellen im Vergleich zum ³H-Thymidineinbau

Konzentrationen (1,5 - 2,5 %) erniedrigte 2-Propanol kontinuierlich den Prozentsatz lebender Zellen, "parallel" zum Abfall der ^3H -Thymidineinbaurrate (Abb. 14a). Äthanol zeigte ein ähnliches Ergebnis. In ConA-Kulturen, die 1,5 % Äthanol enthielten, also die Äthanolmenge, die normalerweise eine maximale Thymidinaufnahme hervorrief, war der Prozentsatz vitaler Zellen leicht erhöht. Ein höherer Äthanolgehalt (2-3 %) inhibierte dagegen die Thymidinaufnahme und reduzierte zunehmend den Prozentsatz lebender Zellen (Abb. 14b).

3.3.3. Beobachtung des Aggregationsverhaltens von ConA stimulierten MMZ bei verschiedenen Alkoholkonzentrationen im Vergleich zum ^3H -Thymidineinbau

Um den Einfluß der stimulationsfördernden Alkohole auf das Aggregationsverhalten ConA-stimulierter MMZ zu untersuchen, wurden jeweils gleiche Zellzahlen zusammen mit ConA und mit ConA plus verschiedene Konzentrationen von 2-Propanol und Äthanol kultiviert. Nach 48-stündiger Kulturzeit wurden die nichtaggregierten Zellen gezählt und der Prozentsatz aggregierter Zellen berechnet. Abbildung 15 zeigt die Prozentsätze aggregierter Zellen bei verschiedenen Alkoholkonzentrationen im Vergleich zum ^3H -Thymidineinbau. Die Abbildung enthält die Mittelwerte der Ergebnisse von vier Experimenten.

Der Prozentsatz aggregierter Zellen stieg von 56 % in ConA-Kulturen ohne 2-Propanol auf 64 % in Kulturen, die ConA + 1 % 2-Propanol enthielten, d.h. die 2-Propanol-

4. DISKUSSION

4.1. PROTEASEHEMMER

Es ist bekannt, daß die mitogene Stimulierung von *B-Lymphozyten* durch Proteasehemmer (PH) inhibiert werden kann (26, 27, 29). Der Einfluß von PH auf die Aktivierung von *T-Lymphozyten* wird dagegen unterschiedlich beurteilt: Einige Autoren beschreiben, daß PH keinen Einfluß auf die mitogene Stimulation von T-Lymphozyten unterschiedlicher Spezies haben (29, 30). VISCHER zeigt eine Inhibition der ConA und PHA-Stimulierung von Maus-Lymphozyten durch die PH SBTI und Trasylol (27). Auch HART (30) zeigt, daß die ConA-Antwort von Maus-Lymphozyten durch SBTI inhibiert wird. Die Arbeiten von HART et al. enthalten jedoch auch Hinweise auf eine Steigerung der mitogenen T-Zellaktivierung bei Hamster-Lymphozyten (28, 30).

In eigenen Experimenten hatten wir einen steigernden Effekt der Proteasehemmer DFP, PMSF, TLCK und SBTI auf den ConA-induzierten ^3H -Thymidineinbau von MMZ beobachtet. Die Steigerung der ConA-Antwort sahen wir nur, wenn wir die Proteasehemmer in einem bestimmten Konzentrationsbereich anwandten (Abb. 5). Vergleichsweise war die ebenfalls regelmäßig beobachtete Inhibition auch mit weniger fein abgestuften PH-Verdünnungen zu erzielen. Mit einer Steigerung der ConA-induzierten ^3H -Thymidinaufnahme bei be-

stimmten PH-Konzentrationen reagierten nur Milzzellen und Thymozyten der verwendeten Balb/c Mäuse, nicht jedoch Lymphozyten, die aus peripherem Blut gewonnen worden waren (Abb. 11). Unsere Experimente waren mit MMZ und ConA-Konzentrationen durchgeführt worden, die jeweils die höchsten ^3H -Thymidineinbauraten hervorriefen (Abb. 1 u. 2). Die Dosis-Wirkungs-Kurven der verwendeten Proteasehemmer waren sich auch bei unterschiedlichen Zellkonzentrationen sowie bei verschiedenen ConA-Konzentrationen *ähnlich*. Für eine Steigerung der ConA-Antwort bei suboptimaler Maus-Milz-Zell-Konzentration wurde weniger DFP benötigt (z.B. 0,75 mM DFP bei 1×10^6 MMZ/ml anstelle von 2 mM DFP bei 3×10^6 MMZ/ml; Abb. 12).

In unstimulierten MMZ-Kulturen führten die PH DFP, PMSF, und TLCK zu keiner Steigerung der ^3H -Thymidinaufnahme (Abb. 5). Sie unterdrückten mit steigender Konzentration den ohnehin geringen Thymidineinbau vollständig. SBTI führte dagegen in Kulturen, die kein Mitogen enthielten, zu einer Stimulation (Abb. 5d). Eine solche Stimulation von MMZ durch SBTI ist auch von HART beschrieben worden (30). Aufgrund dieser Daten können wir annehmen, daß die Stimulation der MMZ durch ConA eine Voraussetzung darstellt für den *steigernden* Effekt der PH DFP, PMSF und TLCK, nicht jedoch für deren inhibierende Wirkung.

Weiter nehmen wir an, daß im Laufe der ConA-Stimulation ein inhibierendes Prinzip entsteht, das direkt oder indirekt eine nur suboptimale ConA-Antwort verursacht. Dieses inhibierende Prinzip (möglicherweise sind daran

eine oder mehrere Proteasen beteiligt) könnte wenigstens teilweise durch die verwendeten Proteasehemmer in bestimmten Konzentrationen entfernt oder aufgehoben werden.

Die Beobachtung, daß Proteasen im Laufe der ConA-Stimulation von MMZ gebildet werden, wurde auch von Mitarbeitern unseres Labors gemacht. HAMMANN et al. (48) zeigten, daß die 3. Komplementkomponente (C3) an ConA-stimulierte T-Blasten gebunden wird und daß PH in bestimmten Konzentrationen die C3-Bindung an ConA-stimulierte T-Blasten inhibieren (für die C3-Bindung ist eine enzymatische Spaltung des nativen C3 in unmittelbarer Nähe der Zellmembran Voraussetzung).

Hinweise auf eine im Laufe der Lymphozytenstimulation entstehende proteolytische Aktivität geben auch die Ergebnisse von LIPSKY (14) und TÖKES (11).

Weiter ist bekannt, daß Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen auf ihrer Oberfläche Proteasen besitzen (6, 9, 10, 45) und insbesondere Makrophagen proteolytische Aktivitäten in das Medium abgeben (9, 17).

In unseren Experimenten konnten wir zeigen, daß sich die DFP-Konzentrationen, die für eine Steigerung der ConA Antwort nötig waren, nach höheren Konzentrationen verschoben, wenn wir den Anteil adhärierender Zellen in der Kultur erhöhten (Abb. 12b). Die effektive DFP-Dosis war dagegen deutlich geringer, nachdem wir die adhärierenden und phagozytierenden Zellen teilweise aus der Kultur

entfernt hatten (Abb. 12a). Deshalb nehmen wir an, daß die adhärrierenden und phagozytierenden Zellen wenigstens teilweise für die Steigerung der ConA-Antwort durch PH verantwortlich sind. Unsere Beobachtung, daß die ConA Antwort von Lymphozyten des peripheren Blutes durch DFP nicht gesteigert werden konnte (Abb. 11), könnte dahingehend interpretiert werden, daß Gewebemakrophagen (oder dendritische Zellen), nicht aber Monozyten die Zellpopulation darstellen, die auf eine Behandlung mit PH "anspricht".

Da wir vermuten, daß Makrophagen für den beobachteten Effekt verantwortlich gemacht werden können, nehmen wir weiter an, daß die Proteasehemmer auf wenigstens eine der zahlreichen Substanzen einwirken, die von Makrophagen abgegeben werden und in der Lage sind, eine Zellproliferation zu unterdrücken. Diese Substanzen sind von ALLISON zusammengefaßt worden (49). PH könnten entweder die Synthese, die Sekretion oder die Funktion der vom Makrophagen abgegebenen inhibitorisch wirkenden Substanzen verhindern und so die Zellproliferation steigern. Interessant sind in diesem Zusammenhang Ergebnisse, die zeigen, daß Serinproteasehemmer die Superoxidproduktion von Makrophagen inhibieren können (50, 51). Superoxid soll aber ebenso wie H_2O_2 an der von Makrophagen vermittelten Suppression der ConA-induzierten Lymphozytenproliferation beteiligt sein (52, 53). HÖFFELD (54) beschreibt gleichzeitig eine Steigerung der Lympho-

zytenproliferation durch Substanzen, die in der Lage sind, die Zellen vor dem zerstörenden Angriff des durch aktivierte Phagozyten gebildeten Superoxids zu schützen. Da eine Hemmung der Superoxidproduktion von Makrophagen durch PH von anderen Autoren gezeigt worden ist (50, 51), könnten die PH z.B. über diesen Mechanismus ihre Wirkung entfalten. Andere Autoren zeigen, daß H_2O_2 sowohl die Aktivität der Cyclooxygenase als auch die Produktion von Prostaglandinen erhöht (55). Prostaglandine werden von Makrophagen gebildet und unterdrücken die Lymphozytenproliferation (49, 53). Ferner könnten PH ihre steigernde Wirkung auf die Lymphozytenproliferation ausüben, indem sie Interleukine (IL) vor der Spaltung durch Enzyme schützen, die von aktivierten Makrophagen abgegeben werden (TLCK inhibierbare Enzyme). Allerdings wurde gezeigt, daß SBTI den IL-1-Effekt auf die mitogene Stimulation von T-Lymphozyten inhibiert (24). Da in unseren Experimenten SBTI die ConA-Antwort steigerte, nehmen wir an, daß die PH möglicherweise einen schützenden Einfluß auf IL-2 ausüben.

Wie die Abbildungen 7 und 8 zeigen, verursachten die PH in bestimmten Konzentrationen eine Steigerung der ConA-Stimulation (ConA-induzierte Proliferation) von MMZ nach etwa 48-stündiger Kulturzeit. Diese Steigerung der ConA-Stimulation wurden jedoch auch dann beobachtet, wenn die PH, in diesem Fall DFP und SBTI, erst 24 Stunden nach Beginn der Kultivierung zugesetzt wurden und

daraufhin für 48 Stunden in der Kultur anwesend waren (Ernte nach 72 Stunden; Abb. 8c). Aus diesen Ergebnissen schließen wir, daß DFP und SBTI innerhalb der ersten 24 Stunden der Kultivierung nicht in der Kultur enthalten sein müssen, um ihren steigernden Effekt auszuüben. Diese Folgerung beinhaltet, daß das oben erwähnte "inhibierende Prinzip" nicht während der ersten 24 Stunden der Kulturzeit entsteht. Dazu paßt auch die Beobachtung von HAMMANN et al. (48), daß PH nur dann den Prozentsatz an C3-tragenden Blasten erhöhen, wenn die MMZ bereits 24 Stunden kultiviert worden sind. Außerdem hatten wir niemals eine Steigerung der ConA-Antwort von MMZ durch PH beobachtet, wenn die Zellen nach 24-stündiger Kulturzeit geerntet worden waren (Abb. 7) - auch nicht als "niedrigere" DFP-Konzentrationen verwendet worden waren.

Um herauszufinden, welche Proteasen an dem stimulationssteigernden Effekt der PH beteiligt sein könnten, untersuchten wir verschiedene PH mit unterschiedlichem Wirkungsspektrum. Da DFP, PMSF und TLCK sich als etwa gleich wirksam erwiesen (Abb. 6), nehmen wir an, daß die möglicherweise beteiligte proteolytische Aktivität Eigenschaften von Trypsin, Plasmin, Thrombin und Papain aufweist, d.h. von jener Gruppe von Enzymen, die durch TLCK inhibiert werden. SBTI war weniger wirksam als die übrigen PH - auch nach Verwendung verschiedener SBTI-Präparationen. Wir wissen aber nicht, ob die geringere Wirk-

samkeit von SBTI darauf beruht, daß das Makromolekül SBTI nicht in das Zellinnere einzudringen vermag (30) oder darauf, daß das Wirkungsspektrum des SBTI auf Trypsin und verwandte Enzyme beschränkt ist. Auch können wir nicht entscheiden, ob die PH auf Proteasen in der Kulturflüssigkeit oder auf oberflächengebundene proteolytische Aktivitäten einwirken.

Die Beobachtung, daß der Prozentsatz aggregierter Zellen durch PH-Konzentrationen, die zu einem maximalen Thymidineinbau führten, gesteigert werden konnte (Abb. 10), läßt vermuten, daß die PH wenigstens teilweise durch Beeinflussung von Zellinteraktionen ihren Effekt ausüben (46).

Es scheint unwahrscheinlich zu sein, daß Substanzen des fetalen Kälberserums, wie z.B. Proteasen, für den PH-Effekt verantwortlich sind, weil die Anwendung verschiedener FCS-Konzentrationen den PH-Effekt nicht wesentlich veränderte.

Ein weiterer Punkt muß diskutiert werden: die Beobachtung, daß PH in der Kultur hydrolysiert werden. Um auszuschließen, daß Hydrolyseprodukte von DFP die aktive Substanz darstellen, wurde DFP für 24 bis 48 Stunden gelagert. Gelagertes DFP zeigte jedoch keine Steigerung der ConA-Antwort bzw. eine Steigerung bei deutlich "höheren" DFP-Konzentrationen. Wir nehmen daher an, daß die pro-

teasehemmende Aktivität von DFP für dessen steigernde Wirkung verantwortlich ist. Daß die proteasehemmende Aktivität der PH im Laufe der Kultivierung abnimmt, können wir jedoch annehmen (29). Wie aus der Kinetik des PH-Effektes deutlich wird, führen im Falle von DFP und PMSF zum Zeitpunkt 48 Stunden "relativ zu hohe", d.h. inhibierende Konzentrationen erst zu einem späteren Zeitpunkt zu einer Steigerung der ConA-Antwort (Abb. 7) - vermutlich weil dann erst durch Wirkungsverlust die optimale PH-Konzentration erreicht ist.

Diese Beobachtung läßt uns annehmen, daß für eine optimale ConA-Antwort eine Art Gleichgewicht zwischen Proteasen und Proteasehemmern nötig ist, das sich entweder durch Zunahme proteolytischer Aktivität oder Abnahme von Proteasehemmaktivität im Laufe der Kultivierung einstellt. Auf ein Gleichgewicht zwischen einem "inhibitorischen Prinzip", das während der ConA-Stimulation gebildet wird, und den PH, die eine optimale ConA-Antwort erzielen, weisen drei weitere Ergebnisse dieser Arbeit hin:

1. Die getesteten PH steigerten die ConA-Antwort von MMZ und MTHY nur innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs (Abb. 5 und 11), während höhere PH-Konzentrationen zu einem Absterben der Zellen führten (Abb. 9) und niedrigere Konzentrationen keinen Einfluß auf den Thymidineinbau von MMZ hatten.
2. Nur *stimulierte* Zellen reagierten mit einer Steigerung des Thymidineinbaus (Abb. 5).

3. Der steigernde Effekt der PH hing von der Zellkonzentration ab, insbesondere aber von der Konzentration phagozytischer und adhärrierender Zellen in der Kultur (vgl. Abb. 5 mit Abb. 12).

Die phagozytischen und adhärrierenden Zellen, wahrscheinlich Makrophagen, die sowohl zahlreiche Enzyme als auch PH sezernieren (17), könnten durch den Aufbau dieses Gleichgewichtes an der Regulation der T-Zellaktivierung mit ConA beteiligt sein.

4.2. ALKOHOLE

Eine Steigerung des ConA-induzierten ^3H -Thymidineinbaus von MMZ wurde auch mit 2-Propanol, Äthanol und Azeton in bestimmten Konzentrationen erzielt (Abb. 13). Äthylenglykoll und 1-Propanol zeigten dagegen keine Steigerung des ^3H -Thymidineinbaus weder von ConA-stimulierten noch von unstimulierten MMZ. Interessant ist dabei die Tatsache, daß 2-Propanol und 1-Propanol, zwei physikochemisch nahezu identische Moleküle solch bemerkenswert unterschiedliche Wirkungen auf die ConA-Stimulation haben. Daher vermuten wir, daß die beschriebenen Effekte eine hohe Stereospezifität der beteiligten Reagenzien erfordern. Die mit 2-Propanol, Äthanol und Azeton erzielten Ergebnisse wiesen zu den mit Proteasehemmern gewonnenen Resultaten einige Parallelen auf:

1. Die Steigerung der ConA-Antwort durch 2-Propanol, Äthanol und Azeton wurde nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich beobachtet (Abb. 13 a-c).
2. Die Lebensfähigkeit ConA-stimulierter MMZ war leicht erhöht bei den Äthanol-/2-Propanol-Konzentrationen, die auch den ^3H -Thymidineinbau steigerten (Abb. 14).
3. Es wurden leicht erhöhte Prozentsätze an aggregierten Zellen bei den Äthanol-/2-Propanol-Konzentrationen festgestellt, die auch zu einer Steigerung des ^3H -Thymidineinbaus ConA-stimulierter MMZ führten (Abb. 15).

Deshalb vermuten wir, daß die Alkohol-induzierte Steigerung der ConA-Antwort über ähnliche Wirkmechanismen erfolgt, wie wir sie für die PH diskutiert haben (Entstehung eines "inhibierenden Prinzips" im Laufe der ConA-Stimulation, Ausschaltung einer der zahlreichen von Makrophagen sezernierten Substanzen, die die Lymphozytenproliferation inhibieren).

Dies erscheint nicht unwahrscheinlich, da z.B. im Falle von Äthanol und 2-Propanol eine Hemmung der Abgabe lysosomaler Enzyme durch humane phagozytierende Leukozyten beschrieben worden ist (35). Weiter wurde gezeigt, daß Äthanol zahlreiche Makrophagen-Funktionen inhibiert (35-37). Von SCHEINER (unveröffentlichte Ergebnisse) wurden Experimente durchgeführt, die zeigen, daß 2-Propanol in der Lage ist, Trypsin zu inhibieren, nicht aber 1-Propanol.

Einige Autoren wiesen eine Hemmung von α -Chymotrypsin

durch zahlreiche Alkohole nach (für Äthanol allerdings erst bei höheren Konzentrationen als hier verwendet; 56, 57).

Unterschiedliche Wirkungsmechanismen für PH und Alkohole können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere im Falle der Alkohole bleibt der Wirkungsmechanismus zu klären. Da jedoch die Alkohole von niedrigem Molekulargewicht häufig verwendete Lösungsmittel für lipophile Substanzen sind, halten wir es für wichtig, auf den biologischen Effekt der Alkohole auf die Lymphozytenproliferation aufmerksam zu machen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bestimmte Konzentrationen der Proteasehemmer Di-isopropylfluorophosphat (DFP), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), N- α -tosyl-L-lysyl-L-chloro-methyl-keton (TLCK) und Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (SBTI) waren in der Lage, den ^3H -Thymidineinbau Concanavalin A (ConA)-stimulierter Maus-Milzzellen (MMZ) und Mausthymozyten (MTHY) zu steigern. Wurden dagegen mononukleäre Zellen des peripheren Blutes verwendet, konnte keine Steigerung der ConA-Antwort durch Proteasehemmer festgestellt werden. Die Steigerung der ConA-Antwort konnte nur dann beobachtet werden, wenn die betreffenden Proteasehemmer den Zellkulturen innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs zugesetzt worden waren. Eine Verringerung der Milzzellkonzentration und ein Entfernen der adhärrierenden und phagozytierenden Zellen aus der Zellsuspension führte zu einer Verschiebung der effektiven DFP-Konzentration zu einer geringeren Konzentration. Eine Anreicherung adhärrierender Zellen in der Milzzellkultur führte dagegen zu einer Verschiebung der steigernden DFP-Dosis zu höheren Konzentrationen. Es zeigte sich, daß die Proteasehemmer die ConA Antwort steigerten, wenn sie von Beginn der Kultivierung an in der Kultur für 48 Stunden anwesend waren, aber auch dann, wenn sie 15-24 Stunden nach Beginn der Kultivierung zugesetzt worden waren und daraufhin für 48 Stunden in der Kultur enthalten waren. Innerhalb der ersten 24 Stunden der Kultivierung konnte kein steigernder Effekt der Pro-

teasehemmer auf die ConA-Antwort festgestellt werden. In Konzentrationen, die innerhalb der ersten 24 Stunden der Kultivierung inhibierend gewirkt hatten, verursachten die Proteasehemmer eine Steigerung der ConA-Antwort nach 48-72-stündiger Kultivierung. DFP, PMSF und TLCK steigerten die ConA-Antwort in einem ähnlichen Ausmaß, während SBTI weniger wirksam war. Der Steigerung des ConA-induzierten ^3H -Thymidineinbaus durch Proteasehemmer ging ein leichter Anstieg des Prozentsatzes lebender Zellen parallel. Auch die Aggregation ConA-stimulierter MMZ war leicht erhöht bei den Mengen von Proteasehemmern, die zu einer Steigerung des Thymidineinbaus führten. Aufgrund dieser Ergebnisse nehmen wir an, daß Proteasehemmer in bestimmten Konzentrationen in der Lage sind, eine optimale ConA-Stimulation zu erzielen. Wir vermuten, daß phagozytierende und adhärierende Zellen an diesem Effekt maßgeblich beteiligt sind.

Äthanol, 2-Propanol und Azeton steigerten innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches ebenfalls den ^3H -Thymidineinbau in ConA-stimulierte MMZ. Diese Steigerung der ConA-Antwort war wie bei den Proteasehemmern von einem leichten Anstieg des Prozentsatzes lebender Zellen sowie von einem leichten Anstieg des Prozentsatzes aggregierter Zellen begleitet. Wir nehmen an, daß auch verschiedene Alkohole in bestimmten Konzentrationen in der Lage sind, die ConA-Stimulation zu optimieren.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Bier, O.G.; Götze, D.; Mota, I.; Dias Da Silva, W.:
Experimentelle und klinische Immunologie,
Berlin, Heidelberg, New York: Springer S. 320,
S. 40, S. 39 (1979)
- 2 Benacerraf, B.; Unanue, E.R.:
Textbook of Immunology,
Baltimore, London: Williams & Wilkens, S. 70 (1981)
- 3 Geha, R.S.:
Regulation of human B-cell activation.
Immunological Rev. 45, 276 (1979)
- 4 Larsson, E.-L.; Coutinho, A.; Martinez-A, C.:
A suggested mechanism for T-lymphocyte activation:
Implications on the acquisition of functional reac-
tivities.
Immunological Rev. 51, 66 (1980)
- 5 Bata, J.; Cordier, G.; Revillard, J.P.; Bonneau, M;
Latour, M.:
Modulation of lymphocyte responses by serum protease -
antiprotease systems.
Transplantation and Clinical Immunology 11, 59-70,
Excerpta medica, Amsterdam (1979)
- 6 Grayzel, A.I.; Hatcher, V.B.; Lazarus, G.S.:
Protease activity of normal and PHA stimulated human
lymphocytes.
Cell. Immunol. 18, 210-219 (1975)
- 7 Tökes, Z.A.; Kiefer, H.:
Estimation of cell surface associated protease activi-
ty and its application to lymphocytes.
J. Supramol. Struct. 4, 507-513 (1976)

- 8 Tökes, Z.A.:
Estimation of cell surface associated protease activity and its application to lymphocytes.
Fed. Proc. 34, 533 (1975)

- 9 Bata, J.; Martin, J.P.; Revillard, J.P.:
Cell surface protease activity of human lymphocytes; its inhibition by α -1-antitrypsin.
Experientia 37, 518-19 (1981)

- 10 Lavie, G.; Zucker-Franklin, D.; Franklin, E.C.:
Degradation of serum amyloid A protein by surface associated enzymes of human blood monocytes.
J. Exp. Med. 148, 1020-1031 (1978)

- 11 Tökes, Z.A.; Bruszewski, W.B.; O'Brien, R.L.:
Surface proteolytic activity in cell interactions: Activation of human peripheral lymphocytes in contact with mitogen-treated glass-adherent leukocytes.
Birth Defects: Original Article Series, 14-2, 195-202 (1978)

- 12 Thomson, A.W.; Pugh-Humphreys, R.G.P.; Tweedie, D.J.; Horne, C.H.W.:
Effects of the antiprotease trasylol on peripheral blood leukocytes.
Experientia 34, 528-530 (1978)

- 13 Bata, J.; Deviller, P.; Revillard, J.P.:
Binding of alpha 1 antitrypsin (α 1 protease inhibitor) to human lymphocytes.
Biochemical and Biophysical Research Communications 98-3, 709-716 (1981)

- 14 Lipsky, J.J.; Berninger, R.W.; Hyman, L.R.; Talamo, R.C.:
Presence of alpha-1-antitrypsin on mitogen-stimulated human lymphocytes.
J. Immunol. 122, 24-26 (1979)

- 15 McCormick, J.N.; Nelson, D.; Tunstall, A.M.;
James, K.:
Association of α -macroglobulins with lymphoid cells.
Nature: New Biology, 246, 78 (1973)
- 16 James, K.; Tunstall, A.M.; Parker, A.; McCormick, J.N.:
The association of alpha-2-macroglobulin with lympho-
cyte membranes in chronic lymphocytic leukaemia and
other disorders.
Clin. exp. Immunol. 19, 237-249 (1975)
- 17 Nathan, C.F.; Murray, H.W.; Cohn, Z.A.:
The macrophage as an effector cell.
New Engl. J. Med. 303-11, 622 (1980)
- 18 Habu, S.; Raff, M.G.:
Accessory cell dependence of lectin-induced proliferation
of mouse T-lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 7, 451-457 (1977)
- 19 Resch, K.; Gerns, D.:
The role of macrophages in the activation of T-lym-
phocytes by Concanavalin A. I. Macrophages support
proliferation after commitment of lymphocytes.
Immunobiol. 156, 509-522 (1979)
- 20 Baird, L.G.; Kaplan, A.M.:
Macrophage regulation of mitogen-induced blastogenesis.
I. Demonstration of inhibitory cells in the spleens and
peritoneal exsudates of mice.
Cell. Immunol. 28, 22-35 (1977)
- 21 Suzuki, K.; Tomasi, T.B.:
The regulatory effect of macrophages on the antigen-
induced lymph node cell proliferative response.
Cell. Immunol. 49, 317-328 (1980)

- 22 Stein-Streilein, J.; Hart, D.A.:
Exogenous protease promotes specific antibody forming
cell response in vitro.
Cell. Immunol. 54, 284-292 (1980)
- 23 Kaplan, J.G.; Bona, G.:
Proteases as mitogens.
The effect of trypsin and pronase on mouse and human
lymphocytes.
Exp. Cell Res. 88, 388-394 (1974)
- 24 Katz, S.P.; Shimamura, T.; Dessaint, J.-P.; Braver-
man, D.; Waksman, B.H.:
Mechanisms of action of "Lymphocyte-Activating-Factor" (LAF)
IV. Differential stimulation of T-lymphocytes by induced
macrophage enzymes (catheptic carboxypeptidase B and
serine proteases)
Cell. Immunol. 56, 68-79 (1980)
- 25 Hart, D.A.; Stein-Streilein, J.:
Differential effect of trypsin and trypsin inhibitors
on lipopolysaccharide stimulation of hamster lymphoid cells.
Exp. Cell Res. 107, 434-439 (1977)
- 26 Darzynkiewicz, Z.; Arnason, B.G.W.:
Suppression of RNA synthesis in lymphocytes by inhi-
bitors of proteolytic enzymes.
Exp. Cell Res. 85, 95-104 (1974)
- 27 Vischer, T.L.:
Protease inhibitors reduce mitogen induced lymphocyte
stimulation.
Immunol. 36, 811-813 (1979)
- 28 Hart, D.A.; Streilein, J.S.:
Effect of protease inhibitors on mitogen stimulation
of hamster lymphoid cells.
Exp. Cell Res. 102, 253-263 (1976)

- 29 Ku, G.S.B.; Quigley, J.P.; Sultzer, B.M.:
Time-dependent inhibition of tuberculin-induced
lymphocyte DNA synthesis by a serine protease in-
hibitor.
J. Immunol. 126, 2209-2214 (1981)
- 30 Hart, D.A.:
The effect of soybean trypsin inhibitor on concana-
valin A and phytohemagglutinin stimulation of hamster,
guinea pig, rat, and lymphoid cells.
Cell. Immunol. 32, 146-159 (1977)
- 31 Graf, J.H.; Miescher, P.A.:
Effets métaboliques de l'alcool sur la moelle osseuse
et les éléments figurés.
Ther. Umsch. 38, 444-449 (1981)
- 32 Young, G.P.; Van der Weyden, M.B.; Rose, I.S.; Dudley, F.J.:
Lymphopenia and lymphocyte transformation in alcoholics.
Experientia 35-2, 268-269 (1979)
- 33 Tisman, G.; Herbert, V:
In vitro myelosuppression and immunosuppression by
ethanol.
J. Clin. Invest. 52, 1410-1414 (1973)
- 34 Schrek, R.; Stefani, S.S.:
Effects of alcohol and hyperthermia on normal and
leukemic lymphocytes.
Oncology 38, 69-71 (1981)
- 35 Atkinson, J.P.; Sullivan, T.J.; Kelly, J.P.; Parker, C.W.:
Stimulation by alcohols of cyclic AMP metabolism in
human leukocytes.
J. Clin. Invest. 60, 284-294 (1977)

- 36 Rimland, D.; Hand, W.L.:
The effect of ethanol on adherence and phagocytosis
by rabbit alveolar macrophages.
J. Lab. Clin. Med. 95, 918-926 (1980)
- 37 Spagnulo, P.J.; MacGregor, R.R.:
Acute ethanol effect on chemotaxis and other components
of host defense.
J. Lab. Clin. Med. 86, 24-30 (1975)
- 38 Bhuyan, B.K.; Loughman, B.E.; Fraser, T.J.; Day, K.J.:
Comparison of different methods of determining cell
viability after exposure to cytotoxic compounds.
Exp. Cell Res. 97, 275-280 (1976)
- 39 Tucker, S.B.; Pierre, R.V.; Jordon, R.E.:
Rapid identification of monocytes in a mixed mono-
nuclear cell preparation.
J. Immunol. Methods 14, 267-269 (1977)
- 40 Rumpold, H.; Kraft, D.; Scheiner, O.; Radaskiewicz, Th.:
Influence of carbonyl iron treatment on lymphocyte
subpopulations.
Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 58, 105-109 (1979)
- 41 Sephadex^R-Gel filtration in theory and practice.
Pharmacia Fine Chemicals AB; Uppsala, Sweden, S. 61 (1978-19)
- 42 Hammann, K.P.; Raile, A.; Schmitt, M.; Mussel, H.-H.;
Peters, H.; Scheiner, O.; Dierich, M.P.:
 β 1H stimulates mouse spleen B lymphocytes as demons-
trated by increased thymidine incorporation and for-
mation of B cell blasts.
Immunobiol. 160, 289-301 (1981)

- 43 Roblin, R.; Chou, I.N.; Black, P.H.:
Proteolytic enzymes, cell surface changes, and viral transformation.
Adv. Cancer Res. 22, 203-260 (1975)
- 44 Moreau, P.; Dornand, J.; Kaplan, J.G.:
Inhibition of lymphocyte transformation: effect of soybean trypsin inhibitors and synthetic antiproteases.
Can. J. Biochem. 53, 1337-1341 (1975)
- 45 Pommier, G.; Ripert, A.; Azoulay, E.; Depieds, R.:
Effect of concanavalin A on membrane-bound enzymes from mouse lymphocytes.
Biochem. Biophys. Acta 389, 483-494 (1975)
- 46 Peters, J.H.:
Contact cooperation in stimulated lymphocytes.
I. Influence of cell contact on unspecifically stimulated lymphocytes.
Exp. Cell Res. 74, 179-186 (1972)
- 47 Persson, U.; Hammarström, L.; Möller, E.; Möller, G.; Smith, C.I.E.:
The role of adherent cells in B and T lymphocyte activation.
Immunological Rev. 40, 79 (1978)
- 48 Hammann, K.P.; Scheiner, O.; Schulz, T.; Erdei, A.; Dierich, M.P.:
Binding of the third component of complement (C3) to the Thy 1-1,2 positive ConA induced blasts of murine spleen: modulation of the C3 binding and cell aggregation by protease inhibitors.
Immunology 48-3, 415-22 (1983)
- 49 Allison, A.C.:
Mechanisms by which activated macrophages inhibit lymphocyte responses.
Immunological Rev. 40, 3-27 (1978)

- 50 Goldstein, B.D.; Witz, G.; Amoruso, M.; Troll, W.:
Protease inhibitors antagonize the activation of
polymorphonuclear leukocyte oxygen consumption.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 854-860 (1979)
- 51 Kitagawa, S.; Takaku, F.; Sakamoto, S.:
Evidence that proteases are involved in superoxide
production by human polymorphonuclear leukocytes
and monocytes.
J. Clin. Invest. 65 (1980)
- 52 Metzger, Z.; Hoffeld, J.T.; Oppenheim, J.J.:
 H_2O_2 production by lymphokine-activated macrophages
detected by a chemiluminescence assay (Abstract).
Fed. Proc. 39, 565 (1980)
- 53 Metzger, Z.; Hoffeld, J.T.; Oppenheim, J.J.:
Macrophage-mediated suppression.
I. Evidence for participation of both hydrogen peroxide
and prostaglandins in suppression of murine lymphocyte
proliferation.
J. Immunol. 124, 983-988 (1980)
- 54 Hoffeld, J.T.:
Lipid antioxidants and scavengers of oxygen radicals
enhance immune responses, in vitro.
Fed. Proc. 39, 565 (1980)
- 55 Hember, M.E.; Cook, H.W.; Land, W.E.M.:
Prostaglandin biosynthesis can be triggered by lipid
peroxides.
Arch. Biochem. Biophys. 193, 340-348 (1979)
- 56 Ebina, S.; Kobayashi, T.; Nagai, Y.:
Inhibition of α -chymotrypsin by 2-halogeno-ethanols;
comparison with 2-methyl-ethanols and urea.
Experientia 35, 1011 (1979)

57 Ebina, S.; Nagai, Y.:

Active site structural change of α -chymotrypsin due to 2-halogeno-ethanols; comparison with ethanol, 1-propanol, and urea.

Experientia 36, 534 (1980)

L E B E N S L A U F

Am 6. Januar 1958 wurde ich als Tochter des Polizeioberwachtmeisters Ernst Ehmg und seiner Frau Anneliese, geb. Stelloh in Sulingen/Hann. geboren.

Geschwister: ein 1 Jahr jüngerer Bruder, eine 4 Jahre jüngere Schwester.

1964	Beginn der Grundschulausbildung in Bielefeld
1965 - 1967	Besuch der Grundschule in Rheinhausen
1967 - 1976	Besuch des Mädchengymnasiums "St. Ursula-Schule" in Geisenheim am Rhein
Mai 1976	Abitur an der St. Ursula-Schule
Oktober 1976	Beginn des Studiums der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
August 1978	Ärztliche Vorprüfung
August 1979	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Mai 1980 - Dezember 1982	Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Direktor Prof. Dr. P. Klein) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M.P. Dierich
November 1980	Eheschließung mit dem Pastoralassistenten Markus Raile
März 1982	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April 1982 - April 1983	Praktisches Jahr am Lehrkrankenhaus in Wiesbaden
April 1983	Ärztliche Prüfung am Städtischen Krankenhaus in Wiesbaden bestanden
Mai 1983	Approbation als Ärztin

